

Einfluss der Überexpression von CD83 und miR183 in CD4⁺ T-Zellen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Christina Alter
aus Duisburg

März 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wiebke Hansen

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Daniel Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 2014

Inhalt

1.	Einleitung.....	7
1.1	Die Immunantwort.....	7
1.1.1	CD4 ⁺ T-Helferzellen	8
1.1.2	Regulatorische T-Zellen.....	10
1.2	CD83 und seine Rolle in Immunzellen	13
1.3	MicroRNAs und ihre Rolle in Immunzellen	15
1.4	Gentransfer	21
1.4.1	Transgene Mäuse	21
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
2.	Material	25
2.1	Chemikalien und Lösungen	25
2.2	Puffer.....	26
2.3	Zellkulturmedien	28
2.4	Primer.....	29
2.5	Enzyme und rekombinante Proteine	29
2.6	Plasmide	30
2.7	Kommerzielle Kits.....	31
2.8	Antikörper	32
2.9	Fluorochrome.....	32
2.10	Geräte.....	33
2.11	Zelllinien	33
2.12	Bakterien	33
2.13	Mäuse.....	33
2.14	Software	34

3. Methoden.....	35
3.1 Zellbiologische Methoden.....	35
3.1.1 Einzelzellsuspensionen.....	35
3.1.2 Isolation von Lymphozyten und Dendritischen Zellen mittels MACS-Technologie...	35
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl.....	36
3.1.4 Durchflusszytometrie.....	36
3.1.5 Färbungen für Durchflusszytometrie.....	36
3.1.6 Isolation von Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie.....	37
3.1.7 Proliferationsanalyse von T-Zellen.....	37
3.1.8 Inhibitionsanalyse von T-Zellen.....	38
3.1.9 Bestimmung von Zytokinkonzentrationen mittels Luminex-Technologie.....	38
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	38
3.2.1 RNA Isolation.....	38
3.2.2 cDNA Synthese.....	39
3.2.3 Semiquantitative PCR.....	39
3.2.4 Quantitative PCR.....	40
3.2.5 miRNA Microarray.....	41
3.3 Retrovirale Überexpression von miR183.....	41
3.3.1 Klonierung der miR183-Vorläufersequenz in pRV-IRES-GFP.....	41
3.3.2 Generierung Retroviraler Partikel.....	42
3.3.3 Luciferase-Assay.....	43
3.4 Tierexperimente.....	43
3.4.1 Kontakt Hypersensitivitäts Reaktion.....	43
3.4.2 Mausmodell zur Antigen-spezifischen Induktion von Diabetes.....	44
3.5 Generation einer CD83 Knock Out Maus.....	44
3.5.1 Vorbereitung von MEF-Feeder Platten.....	44

3.5.2	Kultur von murinen embryonalen Stammzellen.....	45
3.5.3	Elektroporation von ES-Zellen mit pRapidFlirt-CD83targetvectorII	45
3.5.4	Southern Blot Screening	45
3.5.5	Blastozysten Injektion und weiterführende Zucht	46
3.6	Statistik.....	46
4.	Ergebnisse	47
4.1	Einfluss der Überexpression von CD83 auf CD4 ⁺ T-Zellen	47
4.1.1	Analyse der CD83 mRNA- und Proteinexpression in CD4CD83 transgenen Mäusen	47
4.1.2	Verteilung von verschiedenen Immunzellen in unterschiedlichen lymphatischen Organen von CD4CD83 transgenen Mäusen.....	51
4.1.3	Funktionelle Analyse der CD4 ⁺ T Zellen aus CD4CD83 transgenen Mäusen <i>in vitro</i> .	53
4.1.4	Einfluss der T-Zell-spezifischen Überexpression von CD83 während einer Kontakt Hypersensitivitäts Reaktion <i>in vivo</i>	55
4.1.5	Generierung einer CD83 Knock Out Maus.....	57
4.2	Einfluss der Überexpression von miR183 auf CD4 ⁺ T-Zellen	62
4.2.1	miR183-Expression in naiven und aktivierten CD4 ⁺ CD25 ⁻ und CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen .	62
4.2.2	Retrovirale Überexpression von miR183 in CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen	63
4.2.3	Funktionelle Charakterisierung der miR183-überexprimierenden CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen <i>in vitro</i>	64
4.2.4	Einfluss von miR183-überexprimierenden T-Zellen auf ein murines Autoimmundiabetes Modell	67
4.2.5	Expression des Transkriptionsfaktors EGR1 und des Signalmoleküls Akt in miR183-überexprimierenden CD4 ⁺ T-Zellen.....	69
5.	Diskussion.....	72
6.	Zusammenfassung.....	83
7.	Literatur	85
8.	Verzeichnisse.....	94

8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	94
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	96
9.	Lebenslauf	99
10.	Erklärungen:	101

1. Einleitung

1.1 Die Immunantwort

Wenn Pathogene, wie beispielsweise Bakterien, einen Wirt befallen, besteht die erste Verteidigungslinie aus dem angeborenen Immunsystem. Die Bestandteile des angeborenen Immunsystems erkennen allgemeine Muster auf Pathogenen z.B. Lipopolysaccharide (LPS) in der Zellwand von Gram⁻ Bakterien oder Lipoteichonsäure in der Zellwand von Gram⁺ Bakterien. Dadurch kann schnell erkannt werden, dass es sich beispielsweise um ein Bakterium handelt, welches dann durch die Aktivität des Komplement Systems, von Makrophagen, Granulozyten und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) schnell beseitigt werden kann, ohne dass starke Krankheitssymptome auftreten. Zusätzlich wird durch die Sekretion von Zytokinen, wie Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) durch aktivierte Makrophagen ein Entzündungsherd vorbereitet, der die Voraussetzungen für eine adaptive Immunantwort schafft. Anders als das angeborene Immunsystem, werden durch das adaptive Immunsystem vielfältige Antigene erkannt. Hier erkennen allerdings wenige Zellen dasselbe Antigen und erst durch Aktivierung einer bzw. weniger spezifischer Zellen beginnen nur diese spezifischen Zellen klonal zu proliferieren. Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen als Teil des adaptiven Immunsystems spielen Dendritische Zellen (DCs), die im entzündeten Gewebe lokalisiert sind und aus der extrazellulären Flüssigkeit Proteine aufnehmen, prozessieren und über *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren. Aktivierte DCs wandern, durch Chemokine geleitet, zu einem lokalen Lymphknoten, in dem sie nur solche naiven T-Zellen aktivieren, die einen T-Zellrezeptor (TCR) exprimieren, der spezifisch das Antigen erkennt, das von den DCs präsentiert wird. Diese aktivierten T-Zellen proliferieren klonal und reifen zu T-Effektorzelle. Die aktivierten T-Zellen verlassen den Lymphknoten und gelangen über den Blutstrom zum Entzündungsherd, der durch die TNF α Wirkung für die T-Effektorzellen zugänglich ist. Dort tragen sie durch spezifische Mechanismen zur Bekämpfung des eingedrungenen Pathogens bei. Neben T-Zellen gehören B-Zellen zum adaptiven Immunsystem. Diese können nach Aktivierung zu Antikörper-produzierenden und -sezernierenden Plasmazellen heranreifen (zusammengefasst in [4]).

1.1.1 CD4⁺ T-Helferzellen

Die T-Zellpopulation, als bedeutender Teil des adaptiven Immunsystems, kann in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: die CD4⁺ und die CD8⁺ T-Zellen. Beide Populationen reifen im Thymus, nachdem sie das Knochenmark als allgemeiner Lymphozytenvorläufer verlassen haben. Durch den Einfluss von Thymus-Epithelzellen beginnen diese Zellen T-Zell-spezifische Moleküle wie Thy1 oder CD2 zu exprimieren und differenzieren zu CD3⁺CD4⁺CD8⁻ Thymozyten. Von diesen differenzieren einige zu CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T-Zellen, die einen T-Zellrezeptor bestehend aus einer γ - und einer δ -Kette exprimieren. Der größte Teil der CD3⁺CD4⁺CD8⁻ Thymozyten allerdings beginnt damit die β -Kette des T-Zellrezeptors umzulagern, d.h. dass durch somatische Mutationen während der VDJ-Rekombination das Gen der β -Kette verändert wird, wodurch eine große Vielfalt an T-Zellrezeptoren entstehen kann. Die neu gebildete β -Kette wird zusammen mit einer vorläufigen α -Kette auf der Zelloberfläche des nun CD3⁺CD4⁺CD8⁺ Thymozyts exprimiert [5]. Nachdem der CD3⁺CD4⁺CD8⁺ Thymozyt auch die α -Kette umgelagert hat, durchläuft er zwei Selektionsschritte. Während der Positivselektion wird überprüft, ob er körpereigene MHC-Allele erkennt, wobei durch die Erkennung von MHC I Molekülen die Expression von CD8 als Co-Rezeptor und durch die Erkennung von MHC II die Expression von CD4 begünstigt wird. Außerdem durchlaufen diese Zellen eine Negativselektion, während der in Zellen mit einer hohen Affinität zu Selbstantigenen wie beispielsweise Peptide, die von Insulin stammen, Apoptose ausgelöst wird [6] oder sie zu einer regulatorischen T-Zelle differenziert (s.u.) [7]. Diese Selektionsschritte überleben nur ca. 2% der selektierten Zellen. Anschließend können die so gereiften T-Zellen den Thymus als entweder CD3⁺CD4⁺ oder CD3⁺CD8⁺ naive T-Zelle verlassen. Diese naiven T-Zellen zirkulieren durch das Blut- und Lymphsystem und siedeln sich in sekundär lymphatischen Organen an.

Nach T-Zellaktivierung differenziert eine CD8⁺ T-Zelle in eine Zytotoxische T-Zelle (CTL), die über Perforin, Granzym und Fas direkt viral oder bakteriell infizierte Zellen sowie Tumorzellen töten kann. Außerdem sezernieren CTLs Interferon γ (IFN γ) und TNF α , die sowohl Wirkungen auf die infizierte Zelle haben, wie die Hochregulation von MHC I Molekülen, aber auch auf die gesamte Entzündungsreaktion, indem beispielsweise Makrophagen aktiviert werden und indem ein Zytokinmilieu geschaffen wird, das die Differenzierung von CD4⁺ T-Helferzellen beeinflusst [zusammengefasst in 4].

CD4⁺ T-Zellen spielen sowohl in der Immunantwort gegen intra- als auch gegen extrazelluläre Pathogene eine Schlüsselrolle. Ihre Hauptaufgabe ist es hierbei, vor allem die Aktivierung

von anderen Zelltypen zu vermitteln. Zwar geht man im Moment davon aus, dass $CD4^+$ T-Zellen in vielen viralen Infektionen nicht benötigt werden, um CTLs zu induzieren [8], die Bildung von $CD8^+$ Gedächtnis T-Zellen hingegen benötigt die Gegenwart von $CD4^+$ T-Zellen [9]. Außerdem wird die $CD4^+$ T-Zellhilfe benötigt, um in B-Zellen die Keimzentrumsreaktion und somit die Produktion von hoch spezifischen Antikörpern (AK) sowie Gedächtnis B-Zellen zu induzieren [10]. Durch die Sekretion von bestimmten Zytokinen (IL17) rekrutieren $CD4^+$ T-Zellen andere Immunzellen wie neutrophile Granulozyten und Monozyten zum Infektionsherd [11]. Auf der anderen Seite können $CD4^+$ T-Zellen aber auch regulatorisch eingreifen und die Effektorfunktionen von anderen Immunzellen hemmen, um beispielsweise die Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu verhindern [12].

Diese Funktionen werden durch $CD4^+$ T-Zellen vermittelt, allerdings nicht alle von derselben Zelle. Die $CD4^+$ T-Helferzellpopulation lässt sich weiter in Subpopulationen aufteilen, deren spätere Linienzugehörigkeit sich, mit Ausnahme der natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen (nTregs), erst während der T-Zellaktivierung entscheidet. Dazu sind drei Signale während der $CD4^+$ T-Zellaktivierung nötig. Das erste Signal ist die spezifische Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und Peptid-beladenem MHC II Molekül auf einer Antigen Präsentierenden Zelle (APC: DCs, B-Zellen oder Makrophagen), wobei CD3 bei der Signalweiterleitung eine wichtige Rolle spielt. Das zweite Signal, ist die Interaktion von CD28 auf der T-Zelle und kostimulatorischen Molekülen der B7-Familie auf der APC. Diese beiden Signale aktivieren $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen und geben Überlebenssignale. Als Folge beginnt die T-Zelle damit, Aktivierungsmarker wie CD25, CD44 und CD69 hoch zu regulieren und CD62L, das die Lokalisation in sekundär lymphatischen Organen vermittelt, herunter zu regulieren. Als Folge der intrazellulären Signalweitergabe der T-Zellrezeptoraktivierung u.a. über den Phosphoinosid-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg beginnt die T-Zelle zu proliferieren [13]. In welche Art von Effektorzelle sich die nun aktivierte T-Zelle entwickelt, hängt vom dritten Signal, dem vorherrschenden Zytokinmilieu ab, in dem die Zelle aktiviert wurde, und das von der APC und anderen Immunzellen bestimmt wird. Es gibt drei Hauptgruppen von $CD4^+$ T-Effektorzellen: T-Helfer 1 (Th1), T-Helfer 2 (Th2) und T-Helfer 17 Zellen (Th17), denen die natürlich vorkommenden (nTregs) und die induzierten (iTregs) regulatorischen T-Zellen gegenüberstehen. Wenn während der T-Zellaktivierung Interleukin (IL) 12 das vorherrschende Zytokin ist, differenziert die T-Zelle in eine Th1-Zelle, die durch die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet und die Sekretion von IFN γ und TNF α charakterisiert ist. Diese Zellen spielen eine wichtige

Rolle, bei der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen, bei der Aktivierung von CTLs und Makrophagen [4, 14, 15].

Ist IL4 das dominierende Zytokin bei der T-Zellaktivierung, entsteht aus der T-Zelle eine Th2-Zelle, die den Transkriptionsfaktor GATA-3 und die Zytokine IL4, IL5 und IL13 sezerniert. Th2-

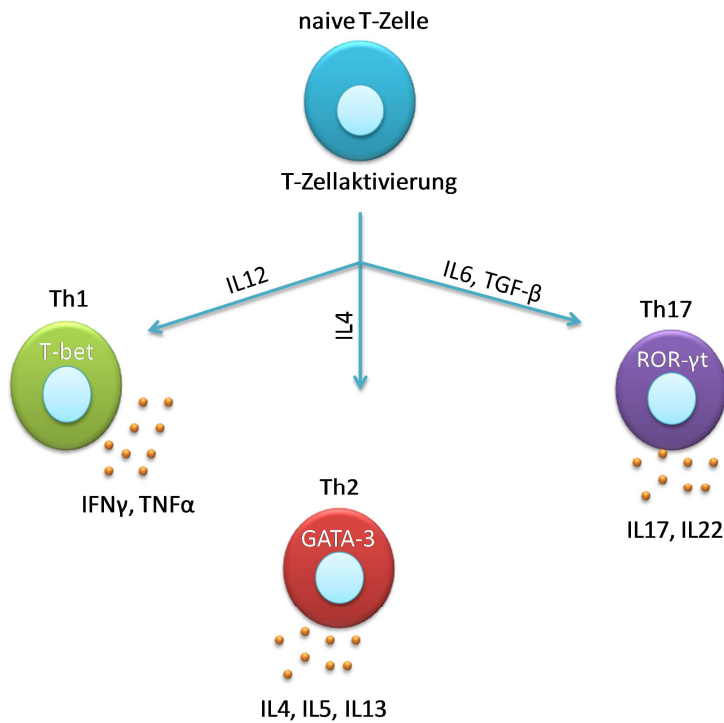


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Differenzierung einer CD4⁺ naiven T-Zelle in eine T-Effektorzelle. Abhängig vom vorherrschenden Zytokinmilieu differenziert eine naive CD4⁺ T-Zelle nach Stimulation entweder in eine Th1-, Th2- oder Th17-Zelle. Vereinfachte Darstellung nach [2], iTregs, Th9 und Th22 wurden hier nicht berücksichtigt.

Zellen sind für die Bekämpfung von extrazellulären Bakterien und Helminthen wichtig, indem sie an der B-Zellaktivierung beteiligt sind [16].

Th17-Zellen entstehen in der Gegenwart von IL6 und *Transforming Growth Factor* (TGF) β . Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR- γ t, produzieren IL17 und IL22 und spielen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von bestimmten bakteriellen und fungalen Infektionen, wie in **Abbildung 1** zu sehen ist [2]. Zusätzlich sind folliculäre T-Helferzellen für die Keimzentrumsreaktion und die Entstehung von Gedächtnis-B-Zellen wichtig [17]. Desweiteren wurde die Existenz von Th9-Zellen [18] und Th22-Zellen [19] beschrieben.

1.1.2 Regulatorische T-Zellen

Einen wichtigen Teil der CD4⁺ T-Zellpopulation bilden die regulatorischen T-Zellen (Tregs). Anders als CD4⁺ T-Effektorzellen, wirken Tregs der Entstehung und dem Fortgang einer Immunantwort entgegen. Zusätzlich zur, im Thymus vermittelten, Selbst-Toleranz (Negativselektion) aller T-Zellen, wirken Tregs aktiv autoreaktiven Immunzellen und pathogenen Immunreaktionen entgegen [20]. Dazu gehören auch die Vermittlung von Toleranz gegenüber

allogenen Transplantaten und die fetal-maternale Toleranz während der Schwangerschaft [21]. Diese Effekte vermitteln Tregs, indem sie Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion vieler Immunzellen, u.a. $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, sowie B-Zellen und andere APCs hemmen. Bei einer Dysfunktion von Tregs kommt es zu fatalen Immun- und Autoimmunerkrankungen sowie Allergien [22]. Darüber hinaus können Tregs aber auch eine Immunantwort verhindern, die gegen Tumorzellen gerichtet ist und so das Tumorwachstum begünstigen [23].

Auch die Treg-Population lässt sich in weitere Subpopulationen unterteilen. Von diesen sind die wichtigsten natürlich vorkommende Tregs (nTregs) und peripher induzierte Tregs (iTregs). nTregs, die den Thymus als regulatorische T-Zelle verlassen exprimieren einen T-Zellrezeptor spezifisch für ein Selbst-Antigen und müssen Antigen-spezifisch aktiviert werden, können anschließend aber auch nicht-Antigen-spezifisch wirken [24]. Im Gegensatz dazu verlassen iTregs den Thymus als naive T-Zelle und werden erst in der Peripherie, während entzündlicher Prozesse in der Gegenwart von TGF- β , IL10 und unreifer DCs zu einem regulatorischen Phänotyp konvertiert [25].

Auch die Suppressionsmechanismen, derer Tregs sich bedienen, um ihre regulatorische Funktion auszuüben sind vielfältig. Es konnten bisher verschiedene Mechanismen beschrieben werden, die Zellkontakt-abhängig oder nicht, eine große Nähe der beteiligten Zellen untereinander benötigen. Tregs können durch die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine (IL10, TGF- β , IL35), durch direkte Zytolyse, durch Beeinflussung aktivierender Signale der Zielzellen und durch Modulation von DC-Reifung und -Funktion, hemmend auf eine Immunantwort wirken [25]. Zusammengefasst in **Abbildung 2**.

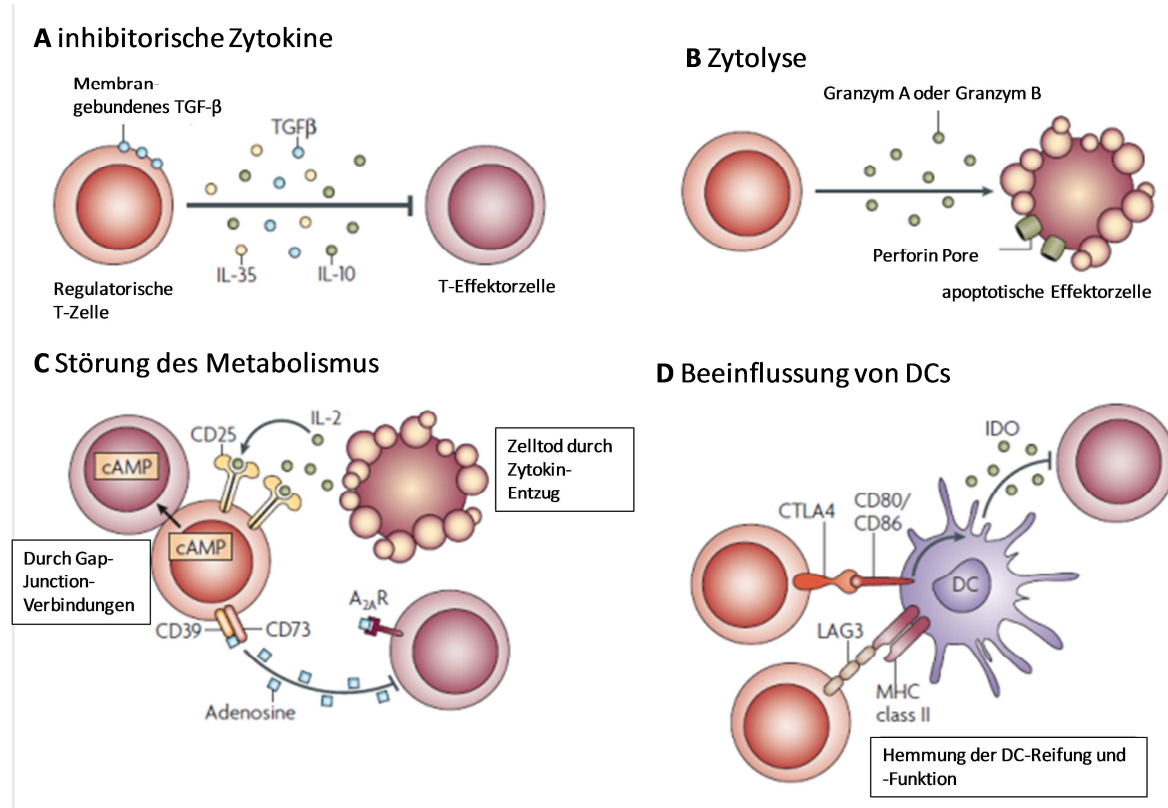


Abbildung 2: Zusammenfassung der wichtigsten Suppressionsmechanismen von Tregs und beteiligter Moleküle. **A** Hemmung der Effektorfunktionen von T-Zellen durch die Wirkung von inhibitorischen Zytokinen wie TGF- β , IL10 oder IL35. **B** Direkte Zytolyse der Effektorzelle durch die Wirkung von Granzymen und Perforin. **C** Störung des Effektorzellmetabolismus durch den Entzug von IL2 über die Bindung an CD25 auf Tregs, die intrazelluläre Wirkung des sekundären Botenmoleküls cAMP, das über Gap-Junctions in die Effektorzelle übermittelt wird oder durch die Bildung von Adenosin durch CD36 und CD73 auf der Oberfläche von Tregs, das über den Adenosin A_{2A} Rezeptor (A_{2A}R) hemmend auf die Zielzelle wirkt. **D** Modifikation der Funktion von DCs durch Tregs. Modifiziert nach [25].

Es wurden eine Reihe von Molekülen beschrieben, die für die Funktion von Tregs wichtig sind. Das wichtigste ist der Transkriptions Faktor *Forkhead Box P3* (FoxP3), der als Masterregulator von Tregs gilt und für ihre Entwicklung, Erhaltung und Funktion essentiell ist [26, 27]. In der Maus dient FoxP3 als Marker für Tregs, im Menschen wird FoxP3 allerdings nach T-Zellaktivierung auch in nicht-regulatorische T-Zellen exprimiert. Trotzdem ist FoxP3 auch in menschlichen Tregs für deren Funktion essentiell, da eine FoxP3-Mutation in Maus (Scurfy-Maus) und Mensch (IPEX = *Immune Dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrom*) zu lymphoproliferativen Erkrankungen führt [28].

Ein weiteres Molekül, das für die Treg-Funktion, aber auch für die Identifizierung von nTregs in der Maus wichtig ist, ist CD25. CD25 ist die α -Kette des IL2 Rezeptors und bindet mit einer sehr hohen Affinität IL2, das T-Zellen als Überlebenssignal benötigen. Naive T-Zellen sind CD25⁻ und exprimieren es erst nach T-Zellrezeptoraktivierung hoch. Im Gegensatz dazu verlassen nTregs den Thymus als CD25⁺ T-Zelle, so dass man in spezifisch Pathogen-frei gehalte-

nen Mäusen CD25 als Treg-Marker verwenden kann. Im Menschen ist der Anteil aktivierter CD4⁺ T-Zellen in der Regel größer, so dass CD25 hier nicht als absoluter Treg-Marker dienen kann, man aber in Verbindung mit der Herunterregulation von CD127, die CD25^{high} CD4⁺ T-Zellen als Tregs ansieht. Über die Expression von CD25 binden Tregs in hohem Maße IL2, das T-Effektorzellen so nicht mehr zur Verfügung steht [29-31].

Andere Moleküle, die wichtige Funktionen in Tregs haben, sind Granzym-B in der Maus, Granzym-A im Menschen und Perforin [32], sowie *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) [33] und Galectin-1 [34], mit deren Hilfe in der Zielzelle Apoptose ausgelöst wird. CD39 und CD73 auf der Oberfläche von Tregs bilden Adenosin, das an den Adenosin Rezeptor 2A auf T-Effektorzellen bindet und deren Funktion hemmt [35]. Außerdem hemmt es die Sekretion von IL6 und fördert die von TGF- β , so dass die Konversion von naiven T-Zellen in Th17-Zellen zu Gunsten von Tregs gehemmt wird [36]. Ein weiteres Molekül, von dem beschrieben wurde, dass Tregs es für ihre maximale Aktivität benötigen, ist *Cytotoxic T Cell antigen 4* (CTLA-4), über das Tregs mit DCs interagieren und diese dazu veranlassen, die Indoleamin 2,3-dioxygenase (IDO) zu exprimieren, die immunsuppressive Metabolite umsetzt [37]. Auch über das *Lymphocyte-Activation-Gene-3* (LAG-3) können Tregs mit DCs interagieren. LAG-3 ist ein Homolog von CD4 und bindet ebenfalls MHC II. Über diese Interaktion hemmt LAG-3 die Reifung von DCs und deren immunstimulatorischen Fähigkeiten (**Abbildung 2**) [38, 39]. Neuropilin-1, das in der Maus nur auf nTregs, nicht aber auf aktivierten T-Zellen vorkommt, bindet *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), das von Tumorgewebe ausgeschüttet wird und reguliert die Infiltration von Tregs in den Tumor, was eine anti-Tumor-Immunantwort verschlechtert [40].

1.2 CD83 und seine Rolle in Immunzellen

CD83 ist ein weiteres Molekül, das auf der Oberfläche von nTregs nachgewiesen werden konnte [41], dessen Funktion auf Tregs aber bisher weitestgehend unerforscht ist. Zuerst beschrieben wurde CD83 1992 allerdings als Marker für reife DCs [42], seine Expression wurde aber auch auf der Oberfläche von aktivierten B-Zellen, aktivierten Makrophagen, aktivierten neutrophilen Granulozyten und auf einer regulatorischen Subpopulation von natürlichen Killerzellen [43] beschrieben. Das CD83-kodierende Gen ist im Menschen auf Chromosom 6 und in der Maus auf Chromosom 13 lokalisiert und es besteht eine 63-prozentige Homologie zwischen den CD83-Aminosäuresequenzen dieser beiden Spezies [44]. Die CD83-Transkription wird durch den *Nuclear Factor* (NF) κ B aktiviert [45-47], woraufhin ein Tran-

skript mit fünf Exons entsteht. Exon 1 kodiert den 5'UTR und ein Leading-Peptid, Exon 2 und 3 den hinteren Teil des Leading-Peptids und eine Immunglobulin-ähnliche Domäne, Exon 4 die Transmembranregion und Exon 5 eine zytoplasmatische Domäne sowie den 3'UTR [48]. Zusätzlich zu diesem *full length* Transkript wurden drei Splicing-Varianten beschrieben [49]. Auf Proteinebene gibt es zwei Erscheinungsformen von CD83, ein membran-gebundenes 45 kDa Protein, das von allen fünf Exons kodiert wird (*full length*) [48] und eine kürzere (26 kDa) Form, die nur aus Exon 2 und 3 besteht und als sCD83 bezeichnet wird, da sCD83 (löslich, engl.: *soluble*) in humanem Serum nachgewiesen wurde [50]. Beide Proteine gehören zur Immunglobulin-Superfamilie, sind glykosyliert und können Schwefelbrücken ausbilden. Von sCD83 sind Homodimere beschrieben worden [51, 52]. Ob sCD83 aber ein Produkt von alternativem Spleißens ist, ist bisher nicht geklärt, da auch vorgeschlagen wurde, sCD83 könne post-translational proteolytisch von der Zelloberfläche geschnitten werden [50], wie es in einer Infektion von DCs mit dem humanen Cytomegalie Virus (CMV) beobachtet wurde [53]. Ein Ligand für CD83 konnte bisher nicht identifiziert werden, es gibt aber Studien, die darauf hinweisen, dass dieser Ligand von DCs [54], Monozyten und aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird [55].

Funktionell wurde von CD83 auf APCs eine immunaktivierende Funktion beschrieben, da CD83 als Marker für reife DCs gilt [48]. Außerdem konnte nicht nur gezeigt werden, dass CD83⁺ DCs T-Zellen aktivieren können [48, 56, 57] sondern auch, dass eine verminderte CD83-Expression auf DCs deren Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren verschlechtert [58]. Außerdem konnte in CD83 Knock Out (KO) Mäusen gezeigt werden, dass DCs und T-Zellen *in vitro* zwar normal funktionieren und auch B-Zellen *in vitro* normal proliferieren, B-Zellen aber weniger MHC II und CD86 exprimieren. Diesbezüglich wurde über einen Zusammenhang mit einer verminderten Immunantwort in der CD83KO Maus in einem Oxazolone-vermittelten Kontaktallergie Modell spekuliert [59]. Dazu kommt, dass die CD83KO Mäuse, bei der Exon 3 bis 5 von CD83 fehlt, eine bis zu 90-prozentige Reduktion der naiven CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie aufwiesen, was durch eine gestörte CD4⁺-T-Zellentwicklung im Thymus ausgelöst wurde. In diesen Tieren konnte kein Einfluss auf den Anteil CD8⁺ oder CD4⁺CD8⁺ Thymozyten entdeckt werden und die Autoren vermuten, dass die CD4⁺-T-Zellentwicklung von der CD83-Expression durch Thymus-Epithelzellen und DCs im Thymus verursacht wurde [59].

Im Gegensatz dazu wurde für sCD83 und für CD83, das von T-Zellen exprimiert wird, eine immunsuppressive Wirkung beschrieben. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Im-

munglobulin-Domäne von CD83 die DC-vermittelte T-Zellproliferation *in vitro* hemmt [54, 60]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass sCD83 Lähmungserscheinungen in einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) prophylaktisch und therapeutisch entgegenwirkt [61], eine gegen Tumore gerichtete Immunantwort hemmt [60], das Transplantatüberleben in einem Cornea-Transplanationsmodell IDO-abhängig verlängert [62] sowie einer experimentellen Kolitis IDO-abhängig entgegen wirkt [63].

Durch die retrovirale Überexpression von CD83 auf $CD4^+CD25^-$ naiven T-Zellen konnte in diesen Zellen ein regulatorischer Phänotyp induziert werden, der sich dahin gehend äußerte, dass die CD83-überexprimierenden T-Zellen *in vitro* schlecht proliferierten, FoxP3 exprimierten und Zellkontaktabhängig die Proliferation von T-Effektorzellen hemmten. Außerdem konnten diese Zellen eine Dinitrofluorobenzen (DNFB) -induzierte Kontaktallergie und EAE in ähnlicher Weise abschwächen, wie frisch isolierte nTregs. Nach Antigen-spezifischer Stimulation zeigten die CD83-überexprimierenden T-Zellen eine verminderte Sekretion von IL17. Darüber hinaus hatte der Überstand einer Kultur von CD83-überexprimierenden T-Zellen keinen Einfluss auf die Proliferation von T-Effektorzellen *in vitro*, was nahe legt, dass die beobachteten Effekte auf die Oberflächenexpression von CD83 und nicht auf eine Beteiligung von sCD83 zurück zu führen waren [41].

Die Rolle von CD83 während einer Immunantwort ist also sehr vielfältig. Auf der Oberfläche von DCs exprimiert, wurde für CD83 eine immunaktivierende Wirkung beschrieben. sCD83 und auf T-Zellen exprimiertes CD83 hingegen wurden eher suppressive Eigenschaften zugeschrieben.

1.3 MicroRNAs und ihre Rolle in Immunzellen

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze (ca. 21 – 23 nt) nicht-Protein-kodierenden RNAs, die die Genexpression auf Translationsebene regulieren können. Die erste miRNA (lin-4) wurde 1993 von Victor Ambros als endogener Regulator der *Caenorhabditis elegans* Entwicklung beschrieben [64]. 1998 wurde durch Andrew Fire und Craig Mello das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) beschrieben, bei der Gene durch exogene dsRNA spezifisch in ihrer Expression inhibiert werden konnten [65]. Dieser Mechanismus, der Inhibition durch exogene RNAs wird mittlerweile den *small interfering* RNAs (siRNAs) zugeschrieben, die sich von den miRNA vor allem dadurch unterscheiden, dass sie die Genomintegrität vor fremden und invasiven Nukleinsäuren, wie viralen Nukleinsäuren, Transposons oder Transgenen, schützen sollen. Die Aufgabe von miRNAs hingegen ist die Regulation von endogenen Genen, außer-

dem werden miRNAs endogen kodiert, d.h. der Organismus in dem sie wirken, kodiert die miRNA-Transkripte im eigenen Genom [3]. Die Wirkungsmechanismen von miRNA und siRNA sind hingegen ähnlich. Beide hemmen die Genexpression auf mRNA-Ebene, indem sie mit einem *RNA-Induced-Silencing-Complex* (RISC) assoziieren und auf eine sequenzabhängige Weise die Ziel-mRNA identifizieren, an sie binden und entweder die Ziel-mRNA abbauen oder deren Translation hemmen. Anders als miRNAs binden siRNA ihre Ziel-mRNA völlig komplementär und man geht davon aus, dass es immer zum Abbau der Ziel-mRNA kommt. miRNAs binden ihre Ziel-mRNA dagegen mit vielen Fehlpaarungen und es kann entweder zum Abbau der Ziel-mRNA oder nur zur translationalen Hemmung kommen. Der Grad der Homologie scheint dabei eine Rolle zu spielen [66].

Die Transkription des miRNA-Primärtranskripts (pri-miRNA) erfolgt durch RNA-Polymerase II. Diese pri-miRNA wird polyadenyliert und erhält ein 5'G-Cap [67]. Das Transkript kann eine einzelne oder ein Cluster von mehreren miRNAs enthalten. Die miRNA-Vorläufersequenz kann sich aber auch in Introns von Protein-kodierenden Genen befinden. In der pri-miRNA befindet sich eine haarnadelförmige Struktur (pro kodierter miRNA), d.h. die pri-miRNA ist über ca. 33 bp unperfekt doppelsträngig und bildet eine terminale Schlaufe [68]. Diese pri-miRNA wird zweimal prozessiert, um eine reife (*mature*) miRNA-Duplex zu erhalten. Der erste Prozessierungsschritt erfolgt durch das RNase III Enzym Drosha im Zellkern und beinhaltet das Herausschneiden der Haarnadelstruktur, der pre-miRNA [69]. Alternativ kann dieser Prozessierungsschritt auch durch das Spleißosom durchgeführt werden [70, 71]. Nach Exportin 5 vermitteltem Kernexport [72], erfolgt der zweite Prozessierungsschritt im Zytoplasma durch die RNase III Dicer. Die terminale Schlaufe wird abgeschnitten, wodurch das reife miRNA-Duplex entsteht. Dieses wird durch RISC entwunden und ein Strang des Duplexes assoziiert mit dem Effektorkomplex [66]. Proteine der Argonaut-Familie spielen im RISC eine wichtige Rolle: sie binden die einzelsträngige miRNA am Zucker-Phosphat-Rückgrat, so dass die Basen frei liegen und die Ziel-mRNA binden können [3]. Welcher Strang des Duplexes an RISC bindet und welcher abgebaut wird, wird durch die relative thermodynamische Stabilität der Duplexenden bestimmt. Der Strang dessen 5'Ende am weniger stabilen Ende des Duplexes liegt, wird in RISC eingebaut [67]. Allerdings kann auch der andere Strang eingebaut werden. Der am häufigsten eingebaute Strang wird als miRNA und der seltener eingebaute Strang als miRNA* bezeichnet [73] (zusammengefasst in [3] und **Abbildung 3**).

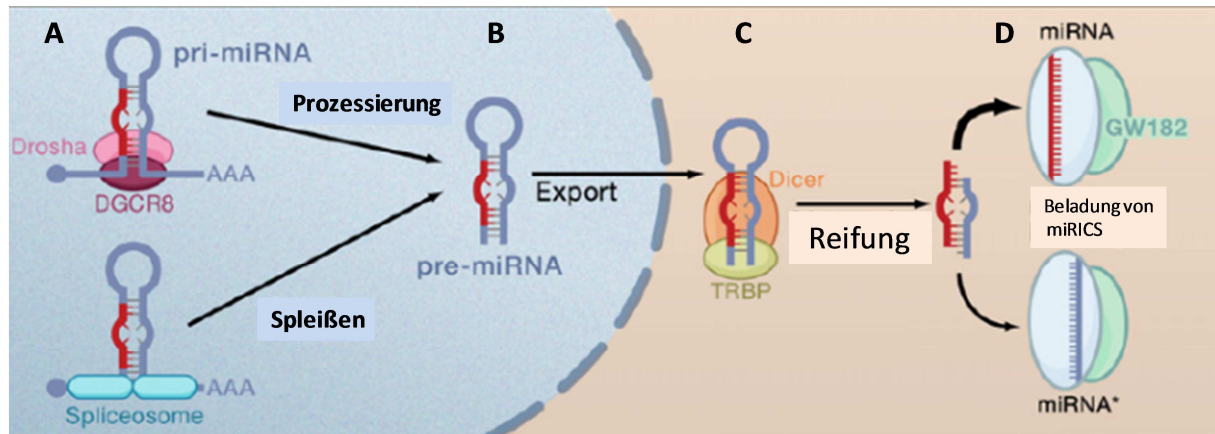


Abbildung 3: Schematische Darstellung der miRNA Prozessierung und deren Assoziation mit RISC. **A** Prozessierung der pri-miRNA durch Drosha und dessen Co-Faktor DGCR8 was zur Entstehung der pre-miRNA führt. Alternativ kann die pre-miRNA auch durch das Spliceosom generiert werden. **B** Export der pre-miRNA ins Zytoplasma. **C** Entstehung des reifen miRNA-Duplexes durch die Aktivität von Dicer und dessen Co-Faktor TRBP. **D** Beladung von RISC, zu dessen Bestandteilen Agonautenproteine und GW182 gehören, mit der einzelsträngigen miRNA oder miRNA*. DGCR8: *DiGeorge Syndrome critical region gene 8*; TRBP: *human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein*; GW182: GW Body Protein 182 (*Gawky*). Modifiziert nach [3].

Assoziiert mit RISC dient die miRNA als Adapter, um sequenzspezifisch die Ziel-mRNA zu binden. Diese Bindung ist allerdings nicht-perfekt, die hier als wichtig erachteten Basen sind Nukleotid 2-8 der miRNA (=Seed Sequenz), deren Bindung von funktioneller Bedeutung ist. Die miRNA-Erkennungssequenz befindet sich in der Regel in mehreren Kopien im 3'UTR der mRNA [3].

Wie der Mechanismus der translationalen Hemmung durch miRISC funktioniert, ist noch nicht völlig verstanden, es gibt aber verschiedene Modelle. Eine Interaktion von miRISC mit dem 5'G-Cap wurde vorgeschlagen, so dass der Initiationsfaktor eIF4E, der normalerweise das 5'G-Cap bindet, um die Translation zu initiieren, nicht mehr binden kann (**Abbildung 4 A**) [74]. Andere Ergebnisse weisen darauf hin, dass miRISC die Assoziation der 60S ribosomalen Untereinheit mit dem 40S Präinitiationskomplex verhindert (**Abbildung 4 B**) [75]. Durch die Deadenylierung der mRNA, würde verhindert werden, dass die mRNA eine zirkuläre Struktur bildet, die die Translation begünstigt. Außerdem würde dadurch die Stabilität der mRNA beeinträchtigt (**Abbildung 4 C**) [76-79]. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Ribosomen von der mRNA dissoziieren (**Abbildung 4 D**) [80], oder es zum Abbau der mRNA kommt (**Abbildung 4 E**) (zusammengefasst in [3]).

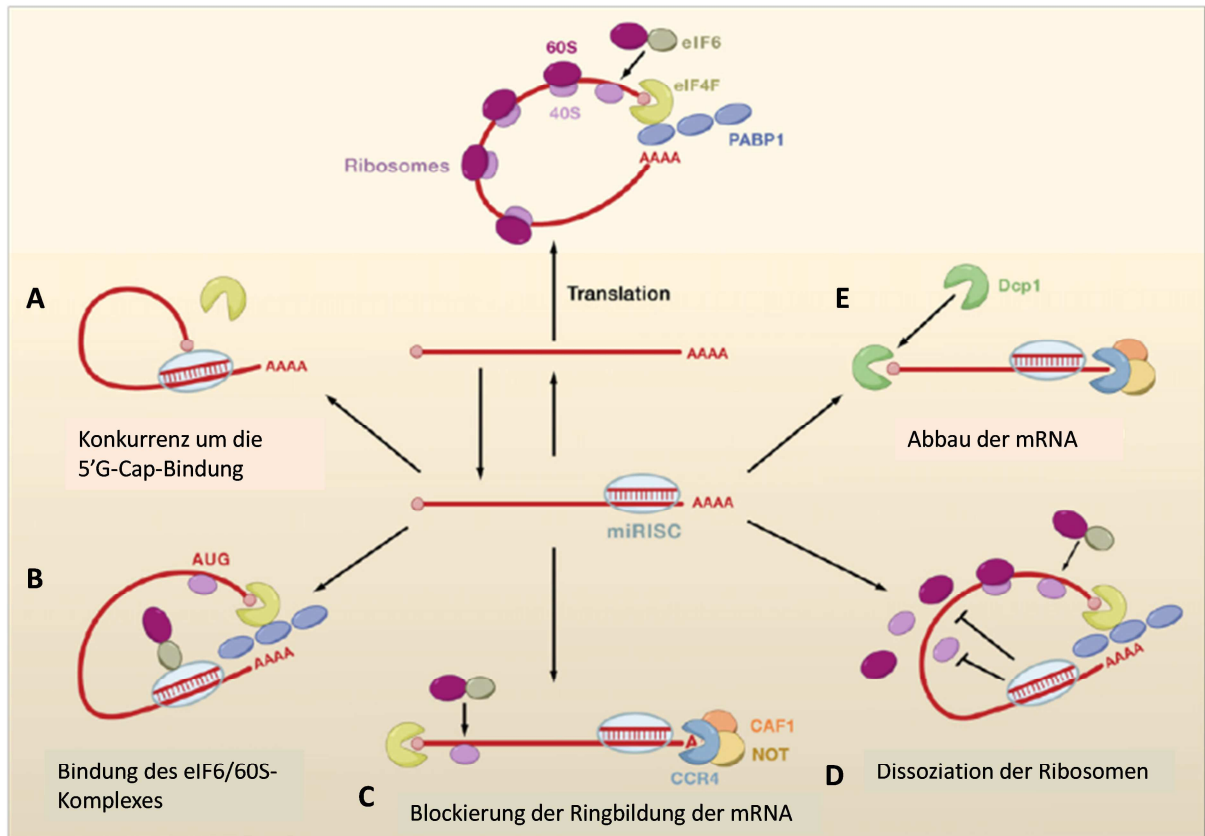


Abbildung 4: Schematische Darstellung verschiedener Mechanismen der translationalen Hemmung durch miRISC. **A** miRISC bindet 5'G-Cap, so dass eIF4F nicht binden kann, um die Translation zu initiieren. **B** miRISC interagiert mit dem Komplex aus der 60S ribosomalen Untereinheit und eIF6 und verhindert die Assoziation mit der 40S ribosomalen Untereinheit. **C** miRISC induziert Deadenylierung der mRNA (durch den Ccr4-Not-Komplex) und verhindert so die Ringbildung der mRNA. **D** miRISC induziert die Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten von der mRNA. **E** miRISC induziert die Deadenylierung und den Abbau des G-Caps, was zum Abbau der mRNA führt. RISC: RNA-induced Silencing Complex, eIF: eukaryotischer Initiationsfaktor, Ccr4-Not-Komplex: Komplex aus u.a. *Carbon catabolite repressor protein 4 homolog Cytoplasmic deadenylase* (Ccr4), *Negative regulator of transcription* (Not) und *CCR4-associated factor 1* (CAF1), dieser Komplex vermittelt neben Ubiquitinierung auch Deadenylierung, Dcp1: *Decapping Protein1*. PABP1: *Polyadenylate binding Protein 1*. Modifiziert nach [3].

Die Genregulation durch miRNA führt allerdings in der Regel nicht zur kompletten Inhibition der Proteinexpression, vielmehr dient es der Feineinstellung [81]. Es wurde außerdem beschrieben, dass es negative Feedback Mechanismen gibt, um die miRNA Expression zu regulieren. So kann ein Transkriptionsfaktor, der die Expression einer miRNA initiiert, durch diese gehemmt werden [82].

Ein Hinweis darauf, dass miRNAs auch in Immunzellen und während einer Immunantwort wichtige Rollen übernehmen, ist die veränderte Expression von vielen miRNAs nach Immunzellaktivierung [83, 84]. Vor allem aber mit Hilfe von Dicer Knock Out Modellen konnte dies belegt werden. Durch die Deletion von Dicer während eines frühen Stadiums der T-Zellentwicklung, wurde eine Verminderung des Anteils der T-Zellen, die einen α/β -T-

Zellrezeptor exprimieren, detektiert [85]. Eine Depletion von Dicer führte im Thymus dazu, dass die Entwicklung von peripheren CD8⁺ T-Zellen gestört war. Außerdem waren Dicer defiziente T-Zellen in ihrer Anzahl vermindert, proliferierten nach Stimulation nur schlecht, hatten eine erhöhte Apoptose-Rate und sezernierten vorwiegend das Zytokin IFN γ [86]. Die gezielte Deletion von Dicer in FoxP3⁺ nTregs führte zu einer verheerenden Autoimmunerkrankung, die sehr ähnlich der Autoimmunerkrankung in Scurfy-Mäusen war. Die Analyse der Treg-Funktion aus den FoxP3-DicerKO Mäusen, die einen Autoimmunphänotyp aufwiesen zeigte, dass sie ihre suppressiven Eigenschaften komplett verloren hatten [87, 88]. Auch in B-Zellen führte die Deletion von Dicer zu Fehlern während der Entwicklung und in der Funktion von reifen B-Zellen [89].

Der Verlust welcher miRNAs für diese Effekte verantwortlich war, ist noch nicht ganz geklärt, allerdings konnten einige miRNAs und ihre Funktionen im Immunsystem bereits identifiziert werden.

MiR155 beispielsweise wird NF κ B-abhängig im Zuge einer Immunantwort verstärkt exprimiert [90] und reguliert die Expression von *Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1* (SHIP1) [91] und *Suppressor of cytokine signaling 1* (SOCS1) [92], was eine erhöhte Aktivität von Interferonen [93] und des Akt-Signalwegs [94] und somit erhöhtes Zellüberleben, Wachstum, Migration und eine verbesserte antivirale Wirkung zur Folge hat. Neben NF κ B aktiviert auch FoxP3 die Expression von miR155 und es wurde über einen Zusammenhang mit der Gewährleistung der proliferativen Fähigkeit von Tregs durch miR155 *in vivo* spekuliert [92]. Außerdem scheint miR155 die Th2 Linienzugehörigkeit einer CD4⁺ T-Zellen zu hemmen, indem sie cMaf (*v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*) hemmt, das die Th2-Differenzierung fördert [95, 96]. Weiterhin konnte miR155 mit der Regulation des Immunglobulin-Klassenwechsels in Verbindung gebracht werden [97].

Eine weitere wichtige miRNA ist miR146a, die ebenfalls durch NF κ B induziert wird [98]. Zu ihren bekannten Ziel-mRNAs gehören die des *TNF receptor associated factor 6* (TRAF6) und der *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1* (IRAK1), zwei Signalmoleküle, die an der Weiterleitung des Toll-like-Rezeptor-Signals beteiligt sind. Die Regulation des Toll-like-Rezeptor-Signals durch miR146a hat zur Folge, dass während einer Entzündung NF κ B weniger aktiviert wird (Negativer-Feedback-Mechanismus) und IL6 und TNF α weniger stark exprimiert werden [98-100]. Eine miR146aKO Maus zeigte eine unkontrollierte, IFN γ -vermittelte, chronische

Autoimmunerkrankung, die einen ähnlichen Phänotyp hatte, wie der, der durch den *Dicer* Knock Out in nTregs verursacht wurde, allerdings weniger aggressiv. Es konnte gezeigt werden, dass das Signalmolekül *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT-1), das durch miR146a kontrolliert wird, in diese übermäßige, Th1-vermittelte, Immunantwort involviert war [101].

Andere miRNAs, die eine Rolle in Immunzellen spielen, sind miR181a, die während der positiven Selektion von T-Zellen im Thymus zur korrekten klonalen Selektion und zur Vermeidung von autoreaktiven T-Zellen beiträgt [102] und miR326, die die Th17-Differenzierung positiv beeinflusst [103]. Von dem miR17-92 Cluster und miR214 konnte gezeigt werden, dass sie Zellwachstum und -expansion fördern, indem PTEN negativ beeinflusst wird [104, 105].

Die, in dieser Arbeit näher untersuchte miR183, ist eine miRNA, die zusammen mit miR96 und miR182 als evolutionär konserviertes miR183/96/182-Cluster auf dem humanen Chromosom 7 und Chromosom 6 der Maus kodiert ist und in der 5'Seed-Sequenz eine hohe Homologie mit ihren Cluster-Mitgliedern teilt [106]. Das miR183/96/182-Cluster wurde mit neurosensorischen Funktionen in Zusammenhang gebracht und ist in der Retina und anderen sensorischen Organen stark exprimiert. Ein Knock Out des gesamten Clusters zeigte seine Beteiligung am Sehvorgang im Auge, da der Knock Out zu Defekten in den Photorezeptoren führte [107]. Außerdem wurde für miR183 eine regulatorische Funktion während degenerativer Prozesse nach einem Cochlear Trauma beschrieben [108]. Das Expressionslevel des miR183/96/182-Clusters wurde als Tumormarker vorgeschlagen, da die Mitglieder der miR183-Familie in vielen Tumorarten hochreguliert, in einigen aber auch herunterreguliert sind [109]. In vielen Tumorarten konnte eine direkte Beteiligung von miR183 oder des gesamten Clusters an der Tumorentstehung sowie Migration und Invasion von Tumorzellen belegt werden [110-115]. Darüber hinaus wurde eine Hochregulation des gesamten Clusters in einer Fallkontrollstudie als Risikofaktor für Lungenkrebs identifiziert [116].

Für miR183 wurden eine Reihe von Proteinen beschrieben, deren Expression von miR183 reguliert sind und die die onkogene Wirkung von miR183 vermitteln. Die Regulation von Ezrin beispielsweise, einem Verbindungsprotein zwischen Zellmembran und Zytoskelett, wurde im Zusammenhang mit Lungentumoren beschrieben [117]. PDCD4, das Apoptose vermittelt, wurde in hepatozellulären Tumoren durch miR183 als herunterreguliert publiziert [111]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Herunterregulation des Transkriptionsfaktor *Early Growth Response 1* (EGR1) in Tumorzellen Migration begünstigt wurde [115]. Dar-

über hinaus sind noch einige weitere Zielproteine beschrieben. Über eine Funktion von miR183 in CD4⁺ T-Zellen oder Tregs im Besonderen sind allerdings bislang keine Veröffentlichungen in der PubMed-Datenbank hinterlegt (März 2014).

1.4 Gentransfer

Um die Funktion von bestimmten Genen in einem lebenden System zu untersuchen, stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, um diese Gene verstärkt zu exprimieren oder aber sie herunter zu regulieren. Die Einführung von Genen und die Kontrolle derer Expression in einzelnen eukaryotischen Zellen kann mittels Transfektion erfolgen, bei der die DNA in Form eines Expressionsvektors mittels verschiedener Verfahren (u.a. Elektroporation, Calcium-Phosphat-Transfektion und Lipofektion wurden für diese Arbeit benutzt) in die Zielzelle eingeführt wird. Die Expressionsstärke wird dabei von einem Promotor kontrolliert, der sich mit dem Transgen zusammen auf dem Plasmid befindet. Diese Plasmide liegen extrachromosomal vor. Nicht jede Zelle lässt sich transfizieren, einige, vor allem primäre Zellen, gelten als schwer zu transfizieren. Für das Einbringen von Fremd-DNA in diese Zellen, besteht die Möglichkeit, dies über virale Vektoren zu tun. Für das Einbringen eines Transgens in einen ganzen Organismus hingegen, muss das Transgen bereits in dessen embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eingebracht werden, aus denen sich der Organismus entwickelt.

1.4.1 Transgene Mäuse

Es gibt verschiedene Vorgehensweisen, um eine transgene Maus zu erzeugen. Eine schnelle Methode, um ein Transgen an einer zufälligen Stelle im Genom zu integrieren, ist die Pronukleus Injektion. Die transgene DNA kann über Mikroinjektion in den Pronukleus, das Stadium bevor sich die Kernhüllen von Spermium und Eizelle aufgelöst haben, einer befruchteten Eizelle injiziert werden [118, 119]. Die exogene DNA wird stabil integriert und an die Tochterzellen vererbt, so dass direkt eine Maus entsteht, die das Transgen in allen Zellen trägt. Da der Integrationsort an einer zufälligen Stelle im Genom liegt, kann sich die Expressionsstärke zwischen mehreren so generierten Tieren unterscheiden oder gar nicht messbar sein, wenn die Integrationsstelle in einem transkriptionell stillgelegten Bereich liegt. Auch die Anzahl der integrierten Kopie schwankt [120]. Eine andere Möglichkeit ist die Infektion eines Embryos im vier bis acht Zellstadium mit Retroviren. Diese Methode wird allerdings dadurch beschränkt, dass die exogene DNA nur ca. 8 kb groß sein darf und deren Expression durch die retroviralen Enhancer beeinflusst wird [121, 122]. Durch homologe Rekombinati-

on, einem spontan ablaufenden Reparaturprozess in der Zelle, kann ein Gen bzw. ein Chromosomenabschnitt gezielt ausgetauscht werden. Bei der homologen Rekombination werden chromosomale Bereiche, die über lange Bereiche homolog zu einer anderen DNA-Sequenz sind über *Cross Over* der DNA-Stränge ausgetauscht. Dieser Mechanismus funktioniert aber auch mit Vektor-DNA [123] und kann für die zielgerichtete Mutagenese in ES-Zellen verwendet werden [124]. Mit dieser Methode können Mutationen eingefügt werden. Es ist aber auch

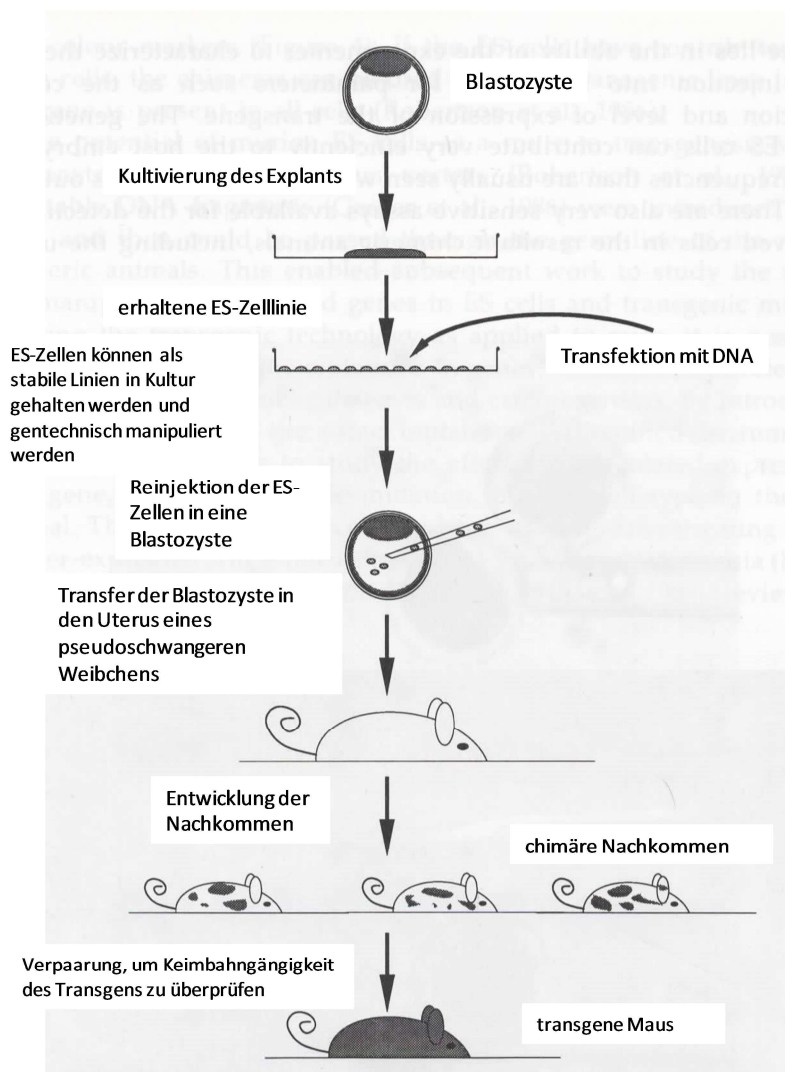


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Verlaufs der Generierung einer transgenen Maus mittels ES-Zellmanipulation und Blastozysten-Injektion. ES-Zellen werden durch die Kultivierung eines Blastozystenexplantates gewonnen und können als stabile ES-Zelllinie gentechnisch manipuliert werden. Durch Transfektion gelangt das Transgen in die ES-Zellen, die nach Überprüfung der richtigen Integration wieder in eine Blastozyste injiziert werden können. Diese kann einer pseudoschwangeren Maus eingesetzt werden um chimäre Nachkommen zu erzeugen. Diese können durch Weiterverpaarung mit einer wildtyp-Maus auf die Keimbahngängigkeit des Transgens überprüft werden. Modifiziert nach [1].

möglich, durch die Deletion eines Exons oder dessen Ersatz durch eine andere Sequenz (beispielsweise eines Selektionsmarkers) die Funktionalität eines Gens zu zerstören und so einen Knock Out zu erzeugen [125-127].

Diese zielgerichtete Mutagenese ist allerdings nur möglich, weil es ES-Zelllinien gibt, die auch in Kultur ihre Pluripotenz beibehalten [128, 129]. Diese ES-Zelllinien stammen direkt von expandierten Blastozysten-Zellen ab und können sich, nach Reinjek-

tion in eine Blastozyste, zu jedem Gewebe des entstehenden Embryos inklusive der Keimbahnzellen, entwickeln [130]. ES-Zellen können stabil in Kultur gehalten werden, wenn sie auf einer

Schicht mitotisch-inaktivierter Fibroblasten-Feeder-Zellen und in Gegenwart des Wachstumsfaktors *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) kultiviert werden [131]. Während dieser Kultur kann die Vektor-DNA durch Elektroporation oder andere Transfektionsmethoden in die ES-Zellen eingefügt werden und die Zellen können unter Selektionsdruck kultiviert werden. Auf diese Weise können gezielt ES-Zellklone selektioniert werden, die die Vektor-DNA aufgenommen haben. Außerdem können diese Klone *in vitro* daraufhin untersucht werden, ob und an welcher Stelle das Transgen in voller Länge ins zelluläre Genom integriert ist [132]. Werden diese ES-Zellen in eine Blastozyste injiziert, entsteht zunächst eine Chimäre, deren Organe und Gewebe zum Teil aus wildtyp ES-Zellen und zum Teil aus transgenen ES-Zellen aufgebaut sind. Wenn die Keimbahn aus den transgenen ES-Zellen entstanden ist, wird das Transgen auf die Nachkommen vererbt und es kann eine transgene Mauslinie erzeugt werden, in der alle Zellen das Transgen tragen (zusammengefasst in [1] und **Abbildung 5**).

Ein weiteres wichtiges Werkzeug, das es möglich macht, konditionale Mutationen einzufügen, die auf bestimmte Gewebe beschränkt oder durch bestimmte Faktoren induziert werden, ist das loxP/Cre-System. Die 34 bp lange loxP-Sequenz (= *Locus of Cross Over*) und das 38 kDa große Protein Cre (= *Causes Recombination*) aus dem Bakteriophagen P1 können dazu benutzt werden die Mutation nur unter bestimmten Bedingungen stattfinden zu lassen [133]. Dazu wird der DNA-Bereich, der modifiziert werden soll, mit loxP-Sequenzen flankiert (gefloxt). Dies geschieht wie oben beschrieben über homologe Rekombination. Die entstandene Mauslinie hat ein funktionelles Protein, in dessen nicht Protein-kodierende Gensequenz loxP-Sequenzen eingefügt wurden. Diese Maus kann nun mit einer Maus verpaart werden, die die Cre-Rekombinase exprimiert. In den Nachkommen dieser Verpaarung schneidet die Cre-Rekombinase an den loxP-Sequenzen und es kommt zum Knock Out. Die Expression der Cre-Rekombinase kann nicht nur durch einen Promotor kontrolliert werden, der in jeder Zelle aktiv ist (z.B. CMV-Promotor), sondern auch gewebe- oder zellspezifisch z.B. unter dem CD4-Promotor, was dazu führt, dass nur CD4-exprimierenden Zellen diesen Knock Out haben [134]. Es können auch Promotoren verwendet werden, die von bestimmten Faktoren induziert werden, so dass die Cre-Expression nur stattfindet, wenn diese Faktoren anwesend sind [135].

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Da eine gestörte Balance zwischen T-Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen zu Autoimmunität und Allergien aber auf der anderen Seite auch zu einem erhöhten Tumorrisiko füh-

ren kann, ist es wichtig zu verstehen, wie beide Populationen funktionieren und welche Moleküle welche Funktion vermitteln, damit die Funktion von $CD4^+$ T-Zellen gezielt therapeutisch beeinflusst werden kann.

Ein Molekül, das in diesem Zusammenhang im Zuge dieser Arbeit untersucht werden sollte, war CD83. Die Rolle von CD83 während einer Immunantwort ist sehr vielfältig. Auf der Oberfläche von DCs exprimiert, wurde für CD83 eine immunaktivierende Wirkung beschrieben, sCD83 und auf T-Zellen exprimiertes CD83 hingegen hatte suppressive Eigenschaften. Welchen Einfluss eine CD83-Überexpression in $CD4^+$ T-Zellen auf das Immunsystem einer CD4CD83 transgenen Maus hatte und wie sich diese Zellen während einer Entzündungsreaktion verhalten, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Dazu sollte einerseits eine CD4CD83 transgenen Maus phänotypisch und funktionell hinsichtlich regulatorischer sowie aktivierender Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Außerdem sollte eine CD83-Flox Maus generiert werden, die dazu benutzt werden kann, verschiedene Gewebespezifische CD83 Knock Out Mäuse zu generieren, um die Funktion von CD83 in weiter führenden Arbeiten untersuchen zu können.

Nicht nur Proteine spielen in der Biologie von $CD4^+$ T-Zellen eine wichtige Rolle. Es wird mehr und mehr klar, dass die Regulation dieser Proteine durch miRNAs eine wichtige Rolle für die Entwicklung, Differenzierung und Funktion von T-Zellen spielt. Einige miRNAs, die Funktionen in Effektor T-Zellen aber auch in Tregs übernehmen, konnten schon identifiziert werden. Trotzdem bleiben miRNAs ein sehr wichtiger Gegenstand der Forschung, um die Funktion von T-Zellen völlig verstehen und therapeutisch manipulieren zu können.

Anhand von miRNA Expressionsanalysen verschiedener $CD4^+$ T-Zellpopulationen sollten daher in dieser Arbeit differenziell exprimierte miRNAs identifiziert und funktionell untersucht werden. Dazu sollten retrovirale Partikel generiert werden, mit denen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen transduziert werden konnten, um die ausgewählte miRNA zu überexprimieren und deren Funktion *in vitro* und *in vivo* zu analysieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zum Verständnis der Funktion und der Regulation von $CD4^+$ T-Zellen beitragen, indem der Einfluss von CD83 und einer miRNA auf $CD4^+$ T-Zellen durch Überexpression näher untersucht werden sollte. Außerdem sollte eine CD83-Flox Maus generiert werden, die, wie auch klonierte miRNA-Expressionsvektoren, für Analysen zur Verfügung stehen, die über diese Arbeit hinaus gehen.

2. Material

2.1 Chemikalien und Lösungen

10 mM MgCl ₂	Promega, Mannheim
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumazetat	Sigma Aldrich, USA
Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Brefeldin	Sigma Aldrich, USA
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester, CFSE	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxynukleosid Triphosphate, dNTPs	Fermentas, St Leon-Rot
Cell Proliferation Dye eFluor® 670	eBioscience, USA
Dinitrofluorobenzen DNFB	Sigma Aldrich, USA
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Geneticin, G418	Biochrom/Merck KGaA, Darmstadt
Fötales Kälber/Bovine Serum, FCS/FBS	Biochrom/Merck KGaA, Darmstadt
Hepes	PAA, GE-Healthcare, UK
Ionomycin	Sigmar Aldrich, USA
IGEPAL® CA-630, NP-40	Sigmar Aldrich, USA
Lineares Polyacrylamid	Ambion, USA
Lipopolysaccachrid, LPS	Sigmar Aldrich, USA
Mitomycin C	Sigmar Aldrich, USA
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phorbol 12-Myristat 13-Azetat, PMA	Sigmar Aldrich, USA
Polybrene	Sigmar Aldrich, USA
Reporter Lyse Puffer 5x	Promega, Mannheim
Trypanblau 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe
Turbofect Reagenz	Fermentas, St. Leon-Rot

gebräuchliche Chemikalien sind hier nicht aufgeführt

2.2 Puffer

ACK-Puffer	155 mM NH_4Cl 9,98 mM KHCO_3 0,5 M EDTA, pH8 pH 7,4
ES-Zelllysepuffer	50 mM Tris, pH8 100 mM EDTA 100 mM NaCl 1% SDS 0,5% Sarcosyl 10 mg/ml Proteinkinase K
FACS-Puffer	2% FCS 2 mM EDTA 1 x PBS-Puffer
HEBS 2x	280 mM NaCl 50 mM Hepes 1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
PBS	136 mM NaCl 2,68 mM KCl 8,09 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 1,47 mM KH_2PO_4 pH 7,4
Southern Blot: Depurination des Gels	0,25 M HCl
SouthernBlot: Denaturierung des Gels	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl

Southern Blot: Neutralisation des Gels	1,5 M NaCl 1 M Tris HCl pH 7,2
Southern Blot: SSC	150 mM NaCl 15 mM Natriumcitrat pH 7
Southern Blot: Denaturierung der Membran	0,4 M NaOH
Southern Blot: Neutralisation der Membran	0,2 M Tris HCl SSC pH 7,5
Southern Blot: Hybridisierungspuffer	0,5 M Natriumphosphat Puffer 7% SDS 10 mM EDTA pH 7,2
Southern Blot: Waschlösung 1	2x SSC 0,1% SDS
Southern Blot: Waschlösung 2	0,2x SSC 0,1% SDS
Southern Blot: Waschlösung 3	0,1x SSC 0,1% SDS
TBE	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2,53 mM EDTA

2.3 Zellkulturmedien

+ ES-Zellmedium:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco Invitrogen
 15% FBS, hitzeinaktiviert
 2 mM L-Glutamin
 0,1 mM nicht-essenzielle Aminosäuren
 1 mM Natriumpyruvat
 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
 10⁶ U Leukämie Inhibierender Faktor (LIF), Zellkulturüberstand
 0,1 mM β-Mercaptoethanol

+ ES-Zelleinfriermedium:

ES-Zellmedium : FBS : DMSO (2 : 2 : 1)

+ ES-Zellselektionsmedium:

ES-Zellmedium mit 200 µg/ml Geneticin

+ IMDM complete:

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) mit GlutaMax®
 und 25 mM Hepes, Gibco Invitrogen
 10% FCS, hitzeinaktiviert
 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
 25 µM β-Mercaptoethanol

+ LB Medium:

Lysogeny Broth, Roth
 50 µg/ml Ampicillin

+ MEF-Feeder-Medium:

DMEM mit GlutaMax®, Gibco Invitrogen
 10% FBS
 0,1 mM nicht-essenzielle Aminosäuren
 1 mM Natriumpyruvat
 100 U/ml Penicillin/Streptomycin

+ MEF-Einfriermedium

MEF-Feeder-Medium : FBS : DMSO (2 : 2 : 1)

2.4 Primer

Die Primer für miR183 und RNU6B stammen von Qiagen, alle übrigen Primer von Eurofins MWG Operon.

Zielgen	Sequenz	Annealing Temperatur
CD83 5'	TCGAGGCCCCCAGGAGAA	55°C
CD83 3'	TTGCAGGTGAAAATGATGAGTGTC	
CD83KO 5'	AGTGACGCTTGGGTTCTGTTAT	58°C
CD83KO 3'	TCTTATCCACTTGGGTTGAGG	
Cre 5'	ACGACCAAGTGACAGCAATG	60°C
Cre 3'	CTCGACCAGTTTAGTTACCC	
EGR1 5'	TTTTTGCCCGTCCCTTTGGTTTCA	58°C
EGR1 3'	GCCCTCTTCCTCGTTTTTGCTCTC	
miR183	miScript Primer Assay, Qiagen	55°C
miR183-Bgl II 5'	AGATCTTGCCGGGGGAGGTGAACGT	58°C
miR183-Xho I 3'	CTCGAGCTGCCCACTTGGGAGTAGGTGAGG	
NeoR 5'	GCTATTCGGCTATGACTGGG	57°C
NeoR 3'	GAAGGCGATAGAAGGCGATG	
RNU6B	miScript Primer Assay, Qiagen	55°C
RPS9 5'	CTGGACGAGGGCAAGATGAAGC	58°C
RPS9 3'	TGACGTTGGCGGATGAGCACA	
Sonde-BamH I 5'	CATGGCTGTCAGACTTCTGT	58°C
Sonde-BamH I 3'	GACTGACATGGCACAACCTTC	
Sonde-EcoR V 5'	ACCGAGAGTCGATCACATATT	58°C
Sonde-EcoR V 3'	GACAAATTTGAATAAGTACAAGC	

2.5 Enzyme und rekombinante Proteine

Asc I	Fermentas, St. Leon-Rot
BamH I	Fermentas, St. Leon-Rot
Bgl II	Fermentas, St. Leon-Rot
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	Invitrogen, Karlsruhe
EcoR I	Fermentas, St. Leon-Rot
EcoR V	Fermentas, St. Leon-Rot

Expand High Fidelity PCR System

La Roche, Schweiz

Go Taq Polymerase

Promega Mannheim

humans rIL2

eBioscience, USA

M-MLV Reverse Transcriptase

Promega Mannheim,

Not I

Fermentas, St. Leon-Rot,

T4 DNA-Ligase

Invitrogen, Karlsruhe

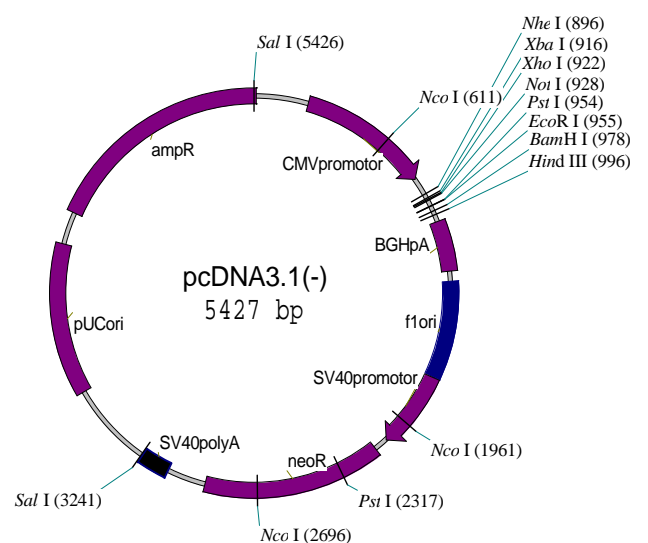
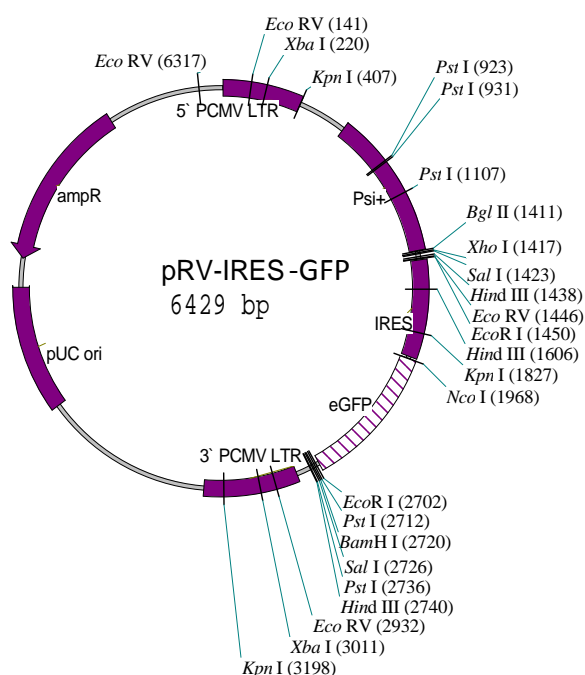
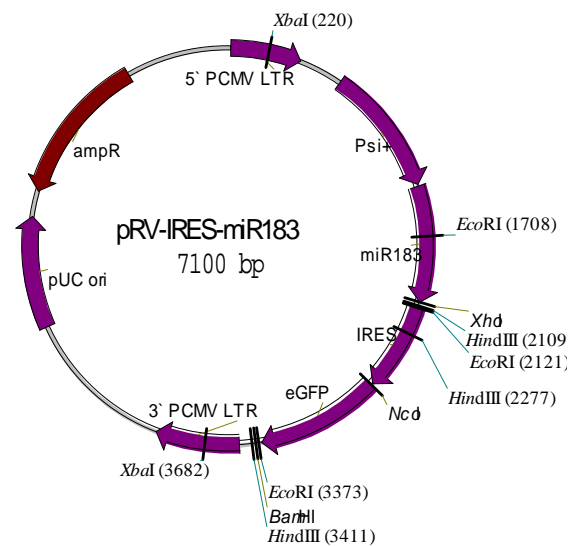
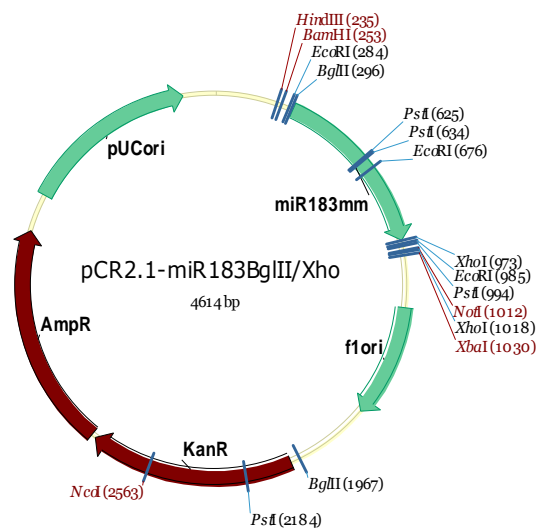
Trypsin-EDTA

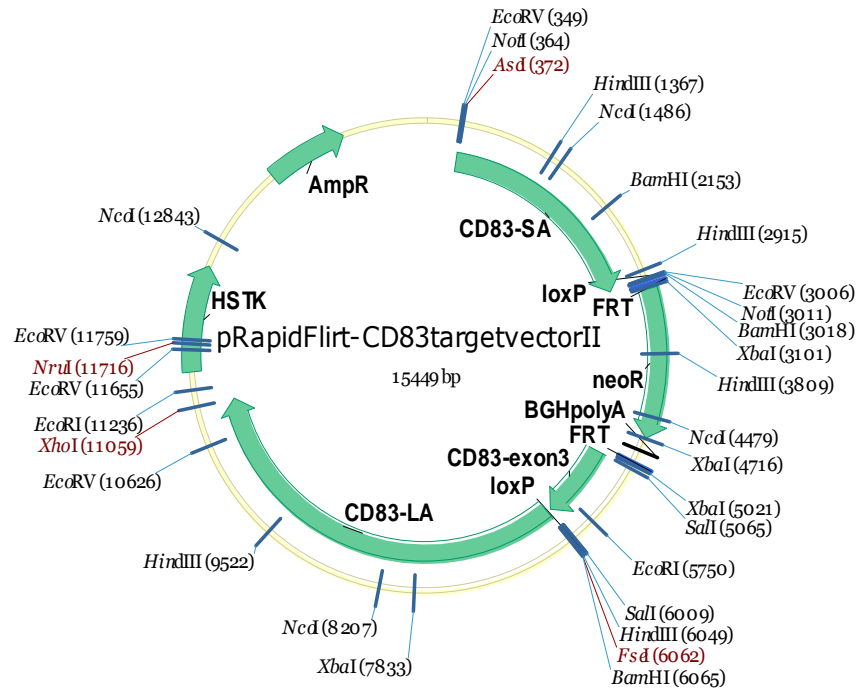
PAA, Österreich

Xho I

Fermentas, St. Leon-Rot

2.6 Plasmide





Das Plasmid pLightSwitch_3UTR183 stammt von der Firma Switch Gear Genomics (Belgien) und das Plasmid pmir-Luc-miR146a von der Firma Signosis (Heidelberg).

2.7 Kommerzielle Kits

Cytofix/Cytoperm Kit	BD Bioscience, USA
Firefly Luciferase Beetle Juice Kit	PJK, Kleinblitterdorf
Expand High Fidelity PCR System	La Roche, Schweiz
FoxP3 Staining Buffer Kit	eBioscience, USA
Gelex II Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
miScript Reversetranscriptions Kit	Qiagen, Hilden
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
NucleoBond PC 500	Machery-Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid	Machery-Nagel, Düren
PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
Power Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	Fermentas, St.Leon-Rot
Renilla-Juice Kit	PJK, Kleinblitterdorf
RNeasy MinElute Clean up Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
TAKARA Ladderman Labeling Kit	TAKARA, Japan
TOPO TA Cloning Kit	Qiagen, Hilden

2.8 Antikörper

Antigen	Herkunftsorganismus	Klon	Hersteller
α Akt	Kaninchen	C67E7	Cell Signaling
α Akt-P-Ser-473	Kaninchen	T308	Cell Signaling
α Akt-P-Thr-308	Kaninchen	S473	Cell Signaling
α CD3	Hamster	145-2C11	BD
α CD4	Ratte	RM4-5 GK1.5 H129.19	BD
α CD8	Ratte	53-6.7	BD
α CD11c	Hamster	M1/70	BD
α CD19	Ratte	1D3	BD
α CD25	Ratte	PC61 7D4	BD
α CD28	Hamster	37.51	BD
α CD69	Hamster	H1.2F3	BD
α CD83	Ratte	3D11	Aviva Systems Biology
α CTLA4	Hamster	UC10-4F10-11	BD
α FoxP3	Ratte	FJK-16s	eBioscience
α IL17A	Ratte	TC11-18H10.1	BioLedgend
α Thy1.1	Ratte	HIS51 OX-7	BD
α Thy1.2	Ratte	53-2.1	BD
Streptavidin			BD

2.9 Fluorochrome

Abkürzung	Fluorochrom	Emission	Exstinktion
7AAD	7-Aminoactinomycin D	488 nm	695 nm
APC	Allophycocyanin	633 nm	660 nm
BV450	Brilliant Violett 450	405 nm	450 nm
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester	488 nm	530 nm
eFl670	eFluor670	633 nm	660 nm
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein	488 nm	530 nm
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	488 nm	530 nm
PB	Pacific Blue	405 nm	450 nm
PE	R-Phycoerythrin	488 nm	575 nm

PerCP	Peridinin-Chlorophyll	488	695
-------	-----------------------	-----	-----

2.10 Geräte

- ✚ Blutzuckermessgerät: Akku Check Sensor, Roche
- ✚ Durchflusszytometer/Zellsorter: FACS Aria II, BD
- ✚ Durchflusszytometer: FACS LSR II, BD, FACS Canto II, BD
- ✚ Luminometer: Orion II, Berthold
- ✚ Magnetische Zellisolation: AutoMACS Pro, Miltenyi Biotech
- ✚ Mikrometer: Ingenieurs Mikrometer, Mitutoyo
- ✚ qPCR Cycler: 7500 Fast Real Time PCR System, ABI
- ✚ Zählkammer nach Neubauer: Assistent
- ✚ Zytokinbestimmung: Luminex Athena Multi Lyte, Progen

gebräuchliche Laborgeräte sind hier nicht aufgeführt

2.11 Zelllinien

- ✚ NIH-3T3 Zellen: murine Fibroblasten
- ✚ GPE86- Zellen: NIH3T3 transfiziert mit Gag, Pol und Env von Mo-MuLV
- ✚ GPE86-GFP: GPE86-Zellen transfiziert mit pRV-IRES-GFP
- ✚ GPE86-miR183: GPE86-Zellen transfiziert mit pRV-IRES-miR183
- ✚ MEF-Zelle: murine embryonale Fibroblasten
- ✚ ES-Zellen: murine embryonale Stammzellen mit Balb/c Hintergrund, Thomas Wunderlich (Köln)

2.12 Bakterien

- ✚ One Shot Top10 chemisch kompetente *E.coli*, Invitrogen

2.13 Mäuse

Die verwendeten Mäuse wurden in der Tierexperimentellen Einheit des UK Essen unter spezifisch pathogen freien (SPF)-Bedingungen in IVC2-Käfigen (IVC = individuell ventilierte Käfige) gehalten und waren zu Versuchsbeginn mindestens 6 Wochen alt. Alle drei Monate wurden Sentinel-Mäuse einer histologischen, serologischen und parasitologischen Gesundheitsüberprüfung zum Ausschluss mikrobieller Kontaminationen durch ein externes Labor unterzogen. Die Durchführung der Tierexperimente erfolgte gemäß der „*Federation of European Laboratory Animal Science Association*“.

Verwendete Mausstämme:

+ Balb/c:

Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln

+ TCR-HA:

mit Balb/c Hintergrund, ca. 30% der T-Zellen exprimieren einen T-Zellrezeptor spezifisch für das Modellantigen Hämagglutinin (HA) [136].

+ INS-HA x Rag2KO:

mit Balb/c Hintergrund, INS-HA x RAG2KO exprimieren das Modellantigen HA unter dem Insulin-Promotor, so dass die Insulin-produzierenden Zellen HA auf ihrer Oberfläche tragen. Zusätzlich findet in dieser Maus durch den RAG2KO keine VDJ-Rekombination statt und es entstehen keine funktionellen B- und T-Zellen.

INS-HA: [137], RAG2KO: [138].

+ CD4CD83:

mit Balb/c Hintergrund, exprimieren CD83 unter Kontrolle des CD4 Promotors.
Wiebke Hansen, UK-Essen

+ Thy1.1:

mit Balb/c Hintergrund, exprimieren Allel 1 von Thy1 (CD90.1). Freundlicherweise von Jochen Hühn (Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

+ CD83Flox:

mit Balb/c Hintergrund, CD83 Exon 3 wird von LoxP-Erkennungssequenz flankiert. Innerhalb der LoxP-Erkennungssequenz liegt außerdem eine NeoR.

+ CMV-Cre:

mit C57BL/6 Hintergrund, exprimieren die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CMV Promotor. Freundlicherweise von Ralph Waldschütz (UK-Essen) zur Verfügung gestellt.

2.14 Software

+ BD FACS DIVA Software 6.0 und 7.0

+ FlowJo 7.2.5

+ Graph Pad Prism 5.02

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Einzelzellsuspensionen

Um aus frisch entnommenen soliden Milzen Einzelzellsuspensionen zu gewinnen, wurden die Milzen mit FACS Puffer gespült. Anschließend wurden die gewonnenen Zellen mit einem 100 µm-Sieb filtriert und 10 min. bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde für 1 min mit 1 ml ACK Puffer inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Nach einem Waschschriff mit FACS Puffer, wurde das Pellet in einer für die folgende Anwendung passendes Volumen aufgenommen.

Für eine Einzelzellsuspension aus Lymphknoten und Thymus wurden diese Organe mit dem Stempel einer 2 ml Spritze durch ein 40 µm Sieb gerieben. Anschließend wurden die gewonnenen Zellen für 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet aus Lymphknotenzellen wurde danach direkt im gewünschten Volumen aufgenommen, das Pellet aus Thymuszellen wurde mit ACK Puffer behandelt (s.o.) und nach dem anschließenden Waschschriff im gewünschten Volumen aufgenommen.

3.1.2 Isolation von Lymphozyten und Dendritischen Zellen mittels MACS-Technologie

Um CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bzw. CD19⁺ B-Zellen und CD11c⁺ DCs aus Milz- und Lymphknotensuspensionen anzureichern, wurden entsprechende Zellisolutionskits für das AutoMACS (Miltenyi Biotech) gemäß den Herstellerprotokollen verwendet. Für die Anreicherung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurde das CD4-Isolutionskit verwendet, wobei dem Antikörper Cocktail von Miltenyi zusätzlich pro Ansatz 1 µl Biotin-gekoppelter αCD25 (BD-Bioscience) Antikörper zugesetzt wurde. Das Prinzip der Miltenyi-Kits besteht darin, bei der positiven Anreicherung (CD19 und CD11c), die Zielzellen mit einem spezifischen Antikörper zu markieren, der mit einem magnetischen Bead gekoppelt ist. Bei der negativen Anreicherung (CD4 und CD8) werden alle nicht gewünschten Zellen mit einem Bead gekoppelt. Mittels AutoMACS werden anschließend über eine magnetische Säule, die Bead-gekoppelten von den unberührten Zellen getrennt.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen in einer Suspension wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension mit Trypanblaulösung um einen definierten Faktor verdünnt und auf die Zählkammer aufgetragen. Auf der Zählkammer befinden sich vier Quadrate, die jeweils noch einmal in 16 Kästchen unterteilt sind. Es wurden die Zellen in allen vier Quadraten gezählt und davon der Mittelwert gebildet. Dieser wurde erst mit dem Verdünnungsfaktor und dann mit 1×10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu berechnen.

3.1.4 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit einem FACS LSR II oder FACS Canto II durchgeführt und mittels DIVA-Software oder Flow-Jo-Software ausgewertet.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen einzeln in einer laminaren Strömung an mehreren Lasern vorbei geleitet werden und so Parameter wie Zellgröße und Granularität gemessen werden. Vor allem wird aber die Emission von Fluorochromen, die an Antikörper gebunden sind, die wiederum Moleküle auf der Zelloberfläche spezifisch binden können, gemessen.

3.1.5 Färbungen für Durchflusszytometrie

Für eine Oberflächenfärbung von Zellen die im Durchflusszytometer analysiert werden sollten wurden zwischen 2×10^5 und 1×10^6 Zellen in 100 µl FACS Puffer gewaschen und anschließend mit einem Antikörper oder einem Mix aus mehreren spezifischen Antikörpern verdünnt in FACS Puffer 10 min bei 4°C gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift, wurden die Zellen in 100 bis 200 µl FACS Puffer aufgenommen und gemessen. Um tote Zellen anzufärben wurde unmittelbar vor der Messung 7AAD 1:40 mit der fertigen Probe verdünnt und 5 min inkubiert.

Auch um Zellen mittels Durchflusszytometrie zu sortieren, wurde diese Färbung verwendet. Da hier aber deutlich höhere Zellzahlen vorlagen, wurde in einem Volumen von 1 bis 2 ml gefärbt. Bevor $CD4^+$ T-Zellen sortiert wurden, wurden diese Zellen mittels MACS vorangereichert.

Um intrazelluläre Proteine wie FoxP3 und CTLA4 zu färben, wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung mit PBS gewaschen und mittels FoxP3 Staining Buffer Kit (eBioscience) nach Herstellerangaben fixiert, permeabilisiert und gefärbt.

Für die Färbung von Zytokinen wurden 5×10^5 Zellen für vier Stunden mit $1 \mu\text{g/ml}$ Ionomycin, 10 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) und $5 \mu\text{g/ml}$ Brefeldin (alle Sigma Aldrich) bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ inkubiert. Ionomycin fördert die Bildung von Zytokinen, wobei Brefeldin verhindert, dass diese Zytokine den Golgi-Apparat verlassen und PMA wirkt mitogen. Anschließend wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd fixiert und mit $0,1\%$ NP-40 gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen das Zielzytokin für 30 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und in FACS-Puffer aufgenommen.

Um das Signalmolekül Akt nachzuweisen wurden 3×10^5 sortierte $\text{CD4}^+\text{GFP}^+$ T-Zellen für 1 Stunde mit $1 \mu\text{g/ml}$ αCD3 stimuliert und mit dem Cytofix/Cytoperm Kit von BD 30 min fixiert. Die fixierten Zellen wurden eine Stunde mit spezifischen Antikörpern gegen Akt und an Ser-473 und Thr-308 phosphoryliertem Akt inkubiert, dann gewaschen und in FACS-Puffer aufgenommen.

3.1.6 Isolation von Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Für bestimmte Anwendungen wie Proliferations- und Inhibitionsassay war es erforderlich, Zellpopulationen besonders sauber zu isolieren. Dies wurde, nach FACS-Färbung (3.1.5), mit dem Durchflusszytometer FACS Aria II (BD Bioscience), das anderes als die Durchflusszytometer FACS LSR II und FACS Canto II (beide BD Bioscience) Zellpopulationen nicht nur anzeigt, sondern auch real sortieren kann, durchgeführt. Auch für die Isolation von GFP^+ Zellen nach retroviraler Transduktion wurde diese Methode verwendet.

3.1.7 Proliferationsanalyse von T-Zellen

Um zu untersuchen, wie schnell T-Zellen (Thy1.2^+) proliferierten, wurde 1×10^5 FACS-sortierte T-Zellen in $200 \mu\text{l}$ IMDM complete in einer 96-Well-Flachbodenplatte (pro Ansatz) mit einem Proliferationsfarbstoff angefärbt. Die CD4CD83 transgenen T-Zellen wurden mit CFSE (Invitrogen) und die miR183 -überexprimierenden T-Zellen mit Cell Proliferation Dye eFluor® 670 (eBioscience) nach Herstellerangaben gefärbt. Diese T-Zellen wurden in Co-Kultur mit 4×10^5 bestrahlten CD4 -depletierten Milzzellen aus einer Thy1.1 -Maus für drei Tage mit $1 \mu\text{g/ml}$ αCD3 aktiviert. Die Verdünnung des Proliferationsfarbstoffes durch Zellteilungen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei wurden tote Zellen mit Hilfe von 7AAD angefärbt und von der Analyse ausgeschlossen. Unter den 7AAD^- Zellen wurden die Thy1.2^+ Zellen ausgewählt und die Fluoreszenz des Proliferationsfarbstoffes wurde in dieser Population gemessen.

3.1.8 Inhibitionsanalyse von T-Zellen

Die inhibitorischen Eigenschaften von T-Zellen wurden untersucht, indem 1×10^5 FACS-sortierte *Responder* $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus einer Thy1.1-Maus mit einem Proliferationsfarbstoff angefärbt wurden. Die $CD4CD83$ transgenen T-Zellen ($Thy1.2^+$) wurden mit CFSE (Invitrogen) und die $miR183$ -überexprimierenden T-Zellen ($Thy1.2^+$) mit Cell Proliferation Dye e-Fluor® 670 (eBioscience) nach Herstellerangaben gefärbt. Von den zu testenden FACS-sortierten T-Zellen wurden 1×10^5 Zellen und zusätzlich 3×10^5 bestrahlten $CD4$ -depletierten Milzzellen aus einer Thy1.2-Maus in Co-Kultur mit den *Responder*-Zellen (1×10^5) für drei Tage mit $1 \mu\text{g/ml}$ $\alpha CD3$ aktiviert. Die Kultur fand in einer 96-Well-Flachbodenplatte in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ IMDM complete statt. Die Verdünnung des Proliferationsfarbstoffes durch Zellteilungen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei wurden tote Zellen mit Hilfe von 7AAD angefärbt und von der Analyse ausgeschlossen, unter den 7AAD⁻ Zellen wurden die $Thy1.1^+$ Zellen ausgewählt und die Fluoreszenz des Proliferationsfarbstoffes in dieser Population gemessen.

3.1.9 Bestimmung von Zytokinkonzentrationen mittels Luminex-Technologie

Die während des Proliferationsassay sezernierten Zytokine wurden mittels Luminex-Technologie gemessen. Es wurden von jedem Ansatz des Proliferationsassay mit $CD4CD83$ transgenen T-Zellen nach drei Tagen Inkubation $100 \mu\text{l}$ zellfreier Zellkulturüberstand abgenommen und davon $50 \mu\text{l}$ für die Analyse verwendet. Pro Ansatz wurden $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $IL10$, $IL17A$, $IL2$, $CCL3$ sowie $IL-12p70$ und $IL-23p19$ gemessen. Um auszuschließen, dass die bestrahlten $CD4$ -depletierten Milzzellen Zytokine sezernieren, wurden auch Ansätze ohne T-Zellen gemessen, hier konnten aber keine Zytokine nachgewiesen werden. Die Überstände der Proliferationsassay mit $miR183$ -überexprimierenden T-Zellen wurden auf den Gehalt von $IL1\beta$, $IL2$, $IL4$, $IL6$, $IL10$, $IL17A$, $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ untersucht.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA Isolation

Um zu untersuchen, welche Gene in einer Zelle abgelesen werden bzw. welche $miRNAs$ in einer Zelle gebildet werden, wurde totalRNA mittels des RNeasy Mini Kits und des RNeasy Plus Mini Kits (beide Qiagen) gemäß dem Herstellerprotokoll isoliert. Die totalRNA, die mittels RNeasy Mini Kit aufgereinigt wurde, wurde anschließend mit linearem Polyacrylamid

und 7,5 M Ammoniumazetat in absolutem Ethanol bei -80°C gefällt. Nach zweimaligem Waschen mit 80% Ethanol wurde die RNA in 15 µl H₂O aufgenommen.

Mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kits und des RNeasy MinElute Clean up Kits wurde die total-RNA in eine Fraktion > 200 bp, in der sich die mRNA befand, und eine Fraktion < 200 bp, in der sich die miRNA befand, aufgetrennt. Die Fraktion > 200 bp wurde wie oben beschrieben gefällt.

3.2.2 cDNA Synthese

Die isolierte RNA wurde entweder direkt (Fraktion < 200 bp) oder nach einer Ethanolfällung in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte nach Herstellerangaben mittels des miScript Reverse-transcriptions Kit (Qiagen) im Falle der Fraktion < 200 bp und in den übrigen Fällen mittels M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus Point Mutant (Promega). Die RNA-Konzentration der Fraktion > 200 bp wurde vor der cDNA Synthese mit Hilfe des Nanodrop Photometers bestimmt und es wurden gleiche Mengen in cDNA umgeschrieben.

3.2.3 Semiquantitative PCR

Der Gehalt des Ribosomalen Proteins S9 (RPS9), das in der quantitativen PCR als *House-Keeping* Gen benutzt wurde, wurde zuvor mittels semiquantitativer Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit cDNA als Template überprüft. Pro Reaktion wurden 0,5 U Gotaq Polymerase benutzt, die in einem Master Mix verdünnt wurde, der 10 mM MgCl₂, 10 µM dNTPs und 25 nM 5' und 3' Primer enthielt.

RPS9:

10 min	94°C	} 30 x
45 sec	94°C	
58 sec	58°C	
1 min	72°C	
10 min	72°C	

Für die Genotypisierung der CD83flox Mäuse wurden die Anwesenheit der Neomycin Resistenz Kasette (NeoR), der Cre-Rekombinase und von CD83 Exon3/NeoR (CD83KO) in genomischer DNA nachgewiesen. Das Enzym und der Mix waren identisch mit dem zum Nachweis von RPS9.

CD83KO und Cre:

10 min	95°C	} 10 x
30 sec	95°C	
1 min 30 sec	58°C CD83KO / 60°C Cre	
1 min 30 sec	72°C	
15 sec	95°C	} 27 x
45 sec	58°C CD83KO / 60°C Cre	
1 min 30 sec	72°C	

NeoR:

5 min	94°C	} 35 x
1 min	94°C	
1 min	57°C	
2 min	72°C	
3 min	72°C	

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel (1% in TBE) aufgetragen, durch Anlegen einer Spannung der Größe nach aufgetrennt und anhand eines Größenstandards analysiert.

3.2.4 Quantitative PCR

Die quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) wurde verwendet, um die relative Menge von mRNAs oder miRNAs in verschiedenen Proben zu vergleichen. Um sicherzustellen, dass die Konzentration der Template-cDNA in verschiedenen Proben insgesamt gleich war, wurde vorher die Konzentration des *House-Keeping* Gens RPS9 mittels semiquantitativer PCR grob bestimmt und die Proben für die qPCR entsprechend vorverdünnt.

Die Detektion von miRNAs wurde mittels miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) und miScript Primer Assay (Qiagen) gemäß den Herstellerprotokollen durchgeführt. Für die Bestimmung von mRNAs wurde das Power Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) und spezifische Primer verwendet.

Um die relative Expression einer spezifischen mRNA bzw. miRNA zu bestimmen, wurde eine Standardgerade verwendet. Um diese zu erzeugen, wurde ein definiertes Volumen jeder Probe zu einem Standard-Pool zusammen gemischt, von dem verschiedene Mengen (3 µl; 1 µl; 0,1 µl und 0,01 µl) gemessen wurden. Die Menge der zu bestimmenden RNA konnte so relativ zur durchschnittlichen Menge aller Proben bestimmt werden. Um auszuschließen, dass Pipettierungenauigkeiten diese relative Expression durch schwankende Templatekonzentrationen beeinflussten, wurde die relative Expression der zu bestimmenden RNA an der Expression eines *House Keeping* Gens (RPS9 im Falle von mRNA und RNU6B im Falle von miRNAs) normalisiert.

3.2.5 miRNA Microarray

CD4⁺CD25⁺ T-Zellen und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus der Milz von Balb/c Mäusen wurden FACS-sortiert und entweder direkt mit RLT-Plus-Puffer (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen) lysiert oder nach zweitägiger *in vitro* Aktivierung mit 0,75 µg/ml immobilisiertem αCD3 und 1 µg/ml löslichem αCD28 lysiert. Aus TCR-HA und TCR-HA x Ig-HA doppeltransgenen Mäusen wurden CD4⁺CD25⁻6.5⁺ T-Zellen sortiert und ebenfalls lysiert. Nach Isolation von totalRNA mittels des RNeasy Plus Mini Kits wurde von der Firma Febit Biomed (Heidelberg) ein miRNA Microarray durchgeführt, die Daten bioinformatisch bearbeitet und die fertige Analyse mit der Genomic Service Nummer: FEAS-129 zurück geschickt. Es wurde ein *Genomic® Biochip MPEA mus musculus* Chip verwendet.

3.3 Retrovirale Überexpression von miR183

3.3.1 Klonierung der miR183-Vorläufersequenz in pRV-IRES-GFP

Zunächst wurde ein 671 bp großer DNA-Bereich aus der chromosomalen Sequenz NC_000072.6 amplifiziert. Der verwendete 5' miR183-Bgl II Primer erkannte eine Sequenz 288 bp upstream von der Mature-miR183-Sequenz und der 3' miR-Xho I Primer eine Sequenz 361 bp downstream davon. Das miR183-Insert wurde mit genomischer Balb/c DNA als Template, 5 µl 10 x Puffer, 25 nM 5' und 3' Primer, 4 µl 10 µM dNTPs und 3,5 U/µl Expand High Fidelity Polymerase (Roche) in einem Gesamtvolumen von 50 µl amplifiziert.

Amplifikation miR183-Vorläufer

3 min	94°C	
10 sec	94°C	} 12 x
45 sec	60°C	
7 min	68°C	
15 sec	94°C	} 23 x
45 sec	60°C	
8 min 30 sec	68°C	
30 min	68°C	

Das entstandene PCR-Produkt wurde spezifisch mittels Gelex II Gelexraktionskit (Qiagen) aufgereinigt und mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) in pCR2.1 nach Herstellerangaben

hinein kloniert. Von fünf Klonen wurden 5 ml Flüssigkulturen angelegt und die Plasmid-DNA mittels NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagerl) präpariert. Diese wurde mit EcoR I (Fermentas) verdaut und auf die Anwesenheit der ca. 700 bp großen miR-183 Sequenz überprüft. Der entstandene Vektor pCR2.1-miR183 wurde sequenziert (GATC Biotech) und genau wie der Zielvektor pRV-IRES-GFP mit den Restriktionsenzymen Bgl II und Xho I (Fermentas) einzeln geschnitten und nach jedem Schritt mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Mittels T4 DNA-Ligase (Invitrogen) wurden die miR183 Sequenz und der aufgeschnittene und dephosphorylierte (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Invitrogen) Vektor pRV-IRES-GFP über Nacht bei 16°C verbunden. Mit 4 µl dieses Ligationsmixes wurde 1 Röhrchen chemisch kompetenter *E.coli* (Invitrogen) nach Herstellerangaben transformiert und auf eine LB-Platte mit 50 mg/ml Ampicillin ausplattiert. Am nächsten Tag wurden fünf Klone gepickt und es wurden 5 ml-Flüssigkulturen angelegt. Um zu überprüfen, ob die miR183-Sequenz und pRV-IRES-GFP richtig ligiert wurden, wurde die Plasmid-DNA isoliert (NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagerl) und mit EcoR I verdaut. Positive Klone zeigten hier drei Banden auf einem 1% Agarosegel bei 3913 bp; 392 bp und 309 bp. Um genug DNA für Folgeanwendungen zu erhalten, wurde aus einer 400 ml Kultur Plasmid-DNA isoliert (NucleoBond PC 500, Macherey-Nagerl).

3.3.2 Generierung Retroviralear Partikel

Um in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen eine miR183-Überexpression zu erzielen, wurden mit Hilfe von pRV-IRES-GFP-miR183 retrovirale Partikel generiert. Dazu wurden NIH-3T3 murine embryonale Fibroblastenzellen, die mit der Gag- und Pol-Region sowie der Env-Region des Moloney murine leukemia Viruses transfiziert worden waren (GPR86-Zellen), benutzt. Diese Zellen wurden mit 5 µg pRV-IRES-GFP-miR183; 0,5 µg pcDNA3.1(-) und 4,5 µg hochmolekularer genomischer DNA aus NIH3T3-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Transfektion transfiziert und für 14 Tage unter G418-Selektionsdruck kultiviert. Diese GPR86-miR183 Zellen bilden, verpacken und sezernieren virale Partikel, die T-Zellen über Mo-MuLV Env infizieren können, um miR183 stabil zu überexprimieren. Der Zellkulturüberstand von 10 175 cm² Zellkulturflaschen mit einem Volumen von 20 ml IMDM complete pro Flasche wurde für vier Stunden bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert, der Großteil des Überstandes verworfen und so auf ca. 10 ml konzentriert und in 1 ml-Aliquots bei -80°C gelagert.

Die zu transduzierenden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden mittels MACS (3.1.2) aus Milz- und Lymphknotenzellsuspensionen angereichert und mit 0,75 µg/ml immobilisiertem αCD3 und

1 µg/ml löslichem αCD28 in einer Zelldichte von 2×10^6 pro *Well* einer 12-*Well*platte für zwei Tage aktiviert. Nach zwei Tagen wurden je zwei *Wells* dieser 12-*Well*platte in einem *Well* einer 6-*Well*platte vereinigt. Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml IMDM complete mit 20 mM Hepes und 1 bis 2 ml konzentriertem Zellkulturüberstand aus entweder GPR86-miR183 oder -GFP Zellkulturen aufgenommen. Dazu kamen 8 µg/ml Polybrene. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen, wurden die Zellen für zwei Stunden bei 25°C und 500 g zentrifugiert. Anschließend wurde rIL2 mit einer Endkonzentration von 50 U/ml hinzugegeben und die Zellen für weitere fünf Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die Analyse des Akt-Signalwegs und das INA-HA x RAG2KO-Modell wurden die Zellen nur für weitere zwei Tage kultiviert. Dann wurden mit Hilfe des FACS Aria II CD4⁺GFP⁺ T-Zellen sortiert und für weitere Experimente verwendet.

3.3.3 Luciferase-Assay

Bevor die miR183-transduzierten T-Zellen auf ihren Phänotyp und ihre Funktion untersucht wurden, wurde überprüft, ob überhaupt eine biologisch funktionelle miRNA gebildet wurde. Zu diesem Zweck wurden 2×10^4 GPE86-miR183 und GFP86-GFP pro *Well* einer 96-*Well*-Flachbodenplatte mit 1 µg pLightSwitch_3UTR183 (Switch Gear Genomics) und 1 µg pmir-Luc-146a (Signosis) mittels Turbofect Reagenz (Fermentas) nach Herstellerangaben transduziert. pLightSwitch_3UTR183 kodiert eine *Renilla* Luciferase-mRNA, in deren 3'UTR sich die Erkennungssequenz für miR183 befindet. pmir-Luc-146a kodiert eine *Firefly* Luciferase mit der Erkennungssequenz von miR146a und wurde hier verwendet, um das *Renilla*-Signal am *Firefly*-Signal zu normalisieren, da die Menge miR146a in den GPE86-miR183 und -GFP nicht verändert wurde. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 20 µl 5 x Reporter Lyse Puffer (Promega) für 40 min bei 4°C lysiert und die Luciferase Aktivität in Gegenwart des *Renilla*- und des *Firefly*-Luciferase Substrates mittels Orion II (Berthold) detektiert.

3.4 Tierexperimente

3.4.1 Kontakt Hypersensitivitäts Reaktion

Der Rücken von CD4CD83 transgenen Mäusen desselben Geschlechts und Alters wurde rasiert und mit 100 µl 0,5% DNFB-Lösung direkt auf der Haut sensibilisiert. Nach fünf Tagen wurde die Dicke eines Ohres mit einem Ingenieur Mikrometer (Mitutoyo) bestimmt. Dasselbe Ohr wurde anschließend von innen und außen mit je 12 µl 0,3 % DNFB-Lösung behandelt.

Nach weiteren zwei Tagen wurde die Dicke des behandelten Ohres gemessen und an der Dicke desselben Ohres vor Behandlung normalisiert.

3.4.2 Mausmodell zur Antigen-spezifischen Induktion von Diabetes

Mäuse der Linie INS-HA x RAG2KO exprimieren das Modellantigen Hämagglutinin (HA) in den Insulin-produzierenden β -Zellen im Pankreas und haben durch ihren RAG2KO Hintergrund keine funktionellen B- und T-Zellen. Werden diesen Mäusen T-Zellen injiziert, die einen T-Zellrezeptor spezifisch für HA haben, wandern diese Zellen in das Pankreas und die Mäuse werden diabetisch, was sich über den Blutglukose-Wert messen lässt. Diesen INS-HA x RAG2KO Mäusen wurden 1×10^5 HA-spezifische T-Zellen intravenös gespritzt, die entweder miR183-GFP oder nur GFP retroviral überexprimierten. Nach 10 bzw. 11 Tagen, sobald die Mehrzahl der Tiere einen Blutzuckerspiegel höher als 200 mg/dl aufwies, wurden sie euthanasiert und analysiert.

3.5 Generation einer CD83 Knock Out Maus

In Zusammenarbeit mit Dr. Nadine Hövelmeyer und Prof. Ari Waisman in Mainz.

3.5.1 Vorbereitung von MEF-Feeder Platten

Für die Kultur von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) wurden zunächst Feeder-Platten generiert, auf denen ES-Zellen wachen können ohne zu differenzieren. Eine Feeder-Platte ist eine 10 cm Zellkulturplatte, auf der ca. $3,5 \times 10^6$ mitotisch inaktivierte murine embryonale Fibroblasten (MEFs) ausplattiert wurden, die nach 6 bis 12 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ für die Benutzung bereit war.

Um diese mitotisch inaktivierten MEFs zu erhalten, wurden zunächst MEFs, die sich noch teilen können, aufgetaut und in MEF-Feeder-Medium bei 37°C und 10% CO₂ auf einer 15 cm Platte kultiviert und expandiert. Konfluente Platten wurden mit MEF-Feeder-Medium mit 10 μ g/ml Mitomycin C für 2 h bei 37°C und 10% CO₂ mitotisch inaktiviert. Anschließend wurden $3,5 \times 10^6$ Zellen pro Röhrchen in MEF-Einfriermedium zunächst in einem Isopropanol Einfrierbehälter 1 h bei -20°C, dann über Nacht bei -80°C und schließlich in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.5.2 Kultur von murinen embryonalen Stammzellen

Ein Röhrchen muriner embryonales Stammzellen mit Balb/c Hintergrund aus dem Jahr 2003 wurde für diese Arbeit von Dr. Thomas Wunderlich (Köln) zu Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden zunächst auf eine 10 cm Feeder-Platte in ES-Zellmedium ausgesät und bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert, wobei jeden Tag das Medium gewechselt wurde. Da die Dichte der ES-Zellen nach zwei Tagen nur sehr gering war, wurden die Zellen trypsinisiert und in ein Well einer 6-Well-Feeder-Platte ausgesät. Bei täglichem Mediumwechsel wurden die ES-Zellen auf 10 cm Platten expandiert. 4×10^6 ES-Zellen wurden in ES-Zell-Einfriermedium zunächst in einem Isopropanol Einfrierbehälter 1 h bei -20°C, dann über Nacht bei -80°C und schließlich in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.5.3 Elektroporation von ES-Zellen mit pRapidFlirt-CD83targetvectorII

Der Targeting Vektor pRapidFlirt-CD83targetvectorII wurde zunächst mit Asc I linearisiert, mit einer Ethanol-fällung aufgereinigt, in H₂O aufgenommen und auf eine Konzentration von 1 µg/ml eingestellt. 1×10^7 trypsinisierte ES-Zellen in 800 µl ES-Zellmedium wurden mit 20 µg bzw. mit 30 µg linearisiertem Vektor 10 min auf Eis inkubiert und dann mit einer Kapazität von 500 µF und einer Spannung von 240 V bei einer Zeitkonstante von 10,2 s (20 µg Vektor) und 10,3 s (30 µg Vektor) elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen wieder 10 min auf Eis inkubiert und schließlich je Ansatz mit einer Dichte von 2×10^6 ES-Zellen pro Ansatz in ES-Zellmedium auf fünf 10 cm Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Ab Tag 2 nach Elektroporation wurde Selektionsmedium mit 200 µg/ml Geneticin für den täglichen Mediumwechsel verwendet. Nach acht Tagen unter Selektionsdruck entstanden gut sichtbare Einzelkolonien. Auf eine Selektion über die Thymidinkinase mit Ganciclovir wurde hier verzichtet. Ca. 600 Klone wurden, ein Klon pro Well, in 96-Well-Feeder-Flachbodenplatten überführt und expandiert. Von positiven Klonen wurden 4×10^6 ES-Zellen eingefroren.

3.5.4 Southern Blot Screening

Die gepickten Klone wurden daraufhin untersucht, ob das Targeting Konstrukt in voller Länge und an der richtigen Stelle im Genom der ES-Zellen integriert hatte. Dazu wurden alle Klone mit ES-Zelllysepuffer bei 56°C über Nacht verdaut und die genomische DNA mit Ethanol gefällt. Diese wurde anschließend mit EcoR V verdaut und auf 0,8% Agarose aufgetragen. Mittels Southern Blot wurde die aufgetrennte DNA auf dem Agarosegel auf eine Nitrozellulose

Membran überführt und bei 80°C für 2h verbunden. 20 ng der durch PCR amplifizierten Sonde-EcoR V wurden mittels TAKARA Ladderman Labeling Kit nach Herstellerangaben mit ^{32}P -dCTP radioaktiv markiert und über Nacht bei 70°C rollend mit der Nitrozellulose inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde ein Kodak MS Biomax Film mit den Signalen der Nitrozellulose über Nacht bei -80°C belichtet und anschließend entwickelt. Die Sonde-EcoR V wurde bei 70°C inkubiert und band im wt Allel an eine 11,8 kb Bande und im transgenen Allel an eine 6,2kb Bande. Da das Transgen nur heterozygot vorlag, wurde immer eine wt-Bande mit detektiert.

Um positive Klone zu bestätigen, wurde ein weiterer Southern Blot durchgeführt, bei dem die genomische DNA mit BamH I geschnitten wurde. Die Sonde-BamH I wurde bei 65°C inkubiert und band eine 10,5 kb wt-Bande und eine 7,5 kb transgene Bande.

3.5.5 Blastozysten Injektion und weiterführende Zucht

Ein als positiv identifizierter Klon wurde von Ronald Naumann, MPI Dresden, in Blastozysten von pseudoschwangeren C57BL/6 Mäuse injiziert. Drei daraus resultierende chimäre Männchen wurden an das Zentrale Tierlabor der Universität Duisburg-Essen geschickt und hier mit Balb/c Weibchen weiter verpaart um homozygote Tiere zu erhalten (CD83-NeoRfl/fl). Diese wurden mit einer Rosa-FLP Maus auf Balb/c Hintergrund verpaart, um die NeoR herauszuschneiden und eine CD83fl/0 Maus zu erhalten, die im homozygoten Zustand (CD83fl/fl) mit einer Cre-exprimierenden Maus verpaart werden kann.

Um vorab zu testen, ob der Knock Out funktioniert, wurde eine CD83-NeoRfl/fl Maus allogon mit einer CMV-Cre Maus mit C57BL/6 Hintergrund verpaart um einen homozygoter Knock Out zu erhalten.

3.6 Statistik

Statistische Analysen wurden mit den, im Ergebnisteil angegebenen Tests durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit der Graph Pad Prism 5.0 Software (Graph Pad Software, La Jolla)

***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss der Überexpression von CD83 auf CD4⁺ T-Zellen

4.1.1 Analyse der CD83 mRNA- und Proteinexpression in CD4CD83 transgenen Mäusen

Um zu untersuchen welchen Einfluss die CD83 Überexpression in naiven CD4⁺ T-Zellen auf deren Funktion und das Immunsystem einer Maus hat, wurde im Vorfeld dieser Arbeit eine CD4CD83 transgene Maus generiert, in der die CD83-Expression durch den CD4-Promotor

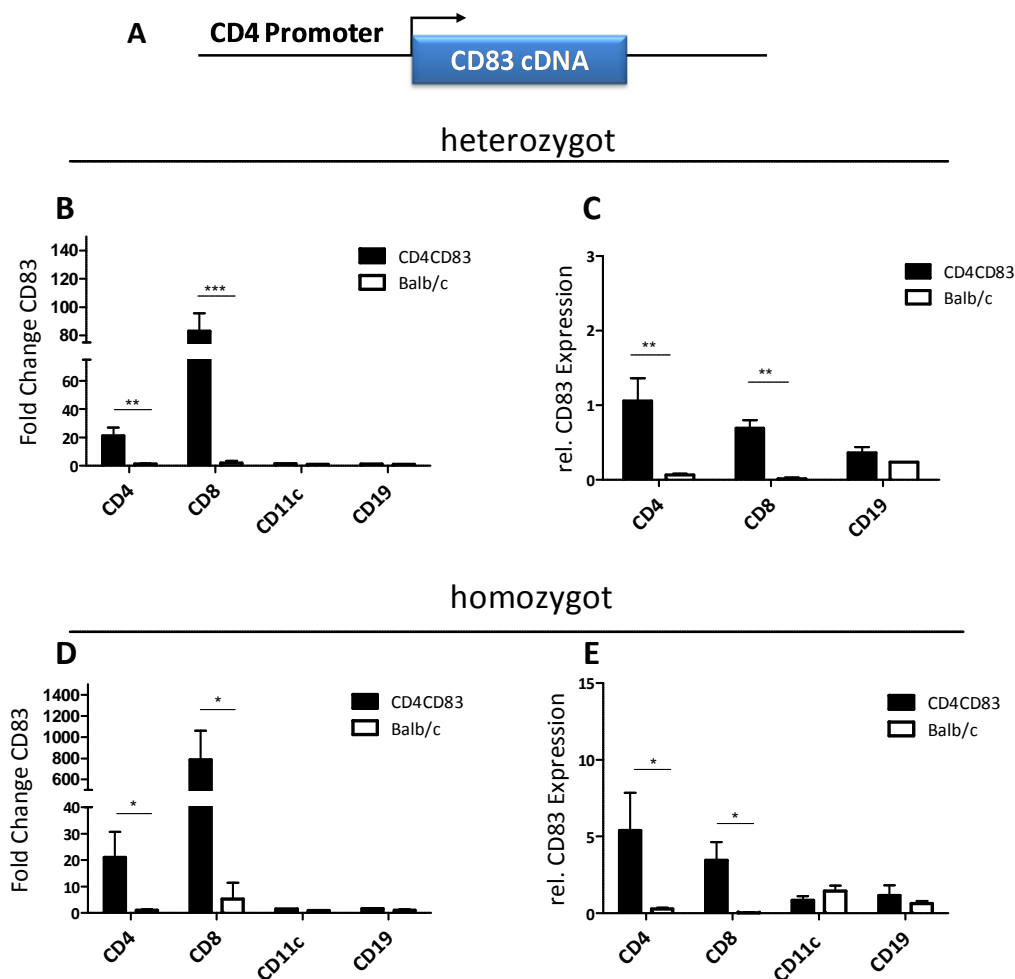


Abbildung 6: Schematische Darstellung des eingefügten Transgens in der CD4CD83 transgenen Maus (**A**) und Vergleich des CD83 mRNA Gehaltes in verschiedenen Immunzellen von CD4CD83 transgenen und Balb/c Mäusen. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie CD11c⁺ DCs und CD19⁺ B-Zellen wurden per MACS-Anreicherung aus der Milz isoliert, mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Menge CD83 mRNA wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. **B** und **C** zeigen das Verhältnis der CD83 mRNA Expression von CD4CD83 heterozygoten zu nicht-transgenen Zellen. **D** und **E** das von CD4CD83 homozygoten zu nicht-transgenen Zellen. **B** und **D** zeigen, um welchen Faktor sich die CD83 Expression in den CD4CD83 transgenen Zellen von der, der jeweiligen nicht-transgenen Zellen unterscheidet (Fold Change). **C** und **E** zeigen die relative Expression. Alle Werte wurden an der RPS9 Expression normalisiert. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt. Für dieses Experiment wurden pro Gruppe ein bis drei Mäuse verwendet. Das Experiment wurde min. zweimal durchgeführt, gezeigt sind repräsentativ Ergebnisse einer Messung.

kontrolliert wird (**Abbildung 6 A**).

Zunächst wurde die CD4CD83 transgene Maus im Hinblick auf die erfolgreiche Überexpression von CD83 auf mRNA und Proteinebene im Vergleich zu nicht transgenen Tiere untersucht.

Abbildung 6 zeigt die mRNA Expression von CD83 in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie in CD11c⁺ DCs und CD19⁺ B-Zellen, isoliert entweder aus heterozygoten oder homozygoten CD4CD83 transgenen Mäusen und deren nicht-transgenen Geschwistertieren. Innerhalb der CD4⁺ T-Zellen sah man in heterozygoten Tieren und in homozygoten Tieren eine ca. 20fache Hochregulation von CD83 in den Zellen, die aus CD4CD83 transgenen Mäusen isoliert wurden, verglichen mit CD4⁺ T-Zellen aus nicht-transgenen Mäusen. Auch in den CD8⁺ T-Zellen sah man eine erhöhte Expression (heterozygot ca. 80fach und homozygot ca. 800fach) von CD83 mRNA in den CD4CD83 transgenen Zellen verglichen mit CD8⁺ T-Zellen aus nicht-transgenen Tieren. In CD11c⁺ DCs und CD19⁺ B-Zellen wurde keine erhöhte CD83 mRNA Expression gemessen (**Abbildung 6 B und D**). Obwohl in CD8⁺ T-Zellen eine deutlich stärkere Erhöhung der CD83 mRNA Expression gemessen wurde als in CD4⁺ T-Zellen aus CD4CD83 transgenen Mäusen, war die relative CD83 Expression im direkten Vergleich von CD4⁺ T-Zellen zu CD8⁺ T-Zellen in CD4⁺ T-Zellen höher (**Abbildung 6 C und E**).

Nachfolgend wurde die Proteinexpression von CD83 mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

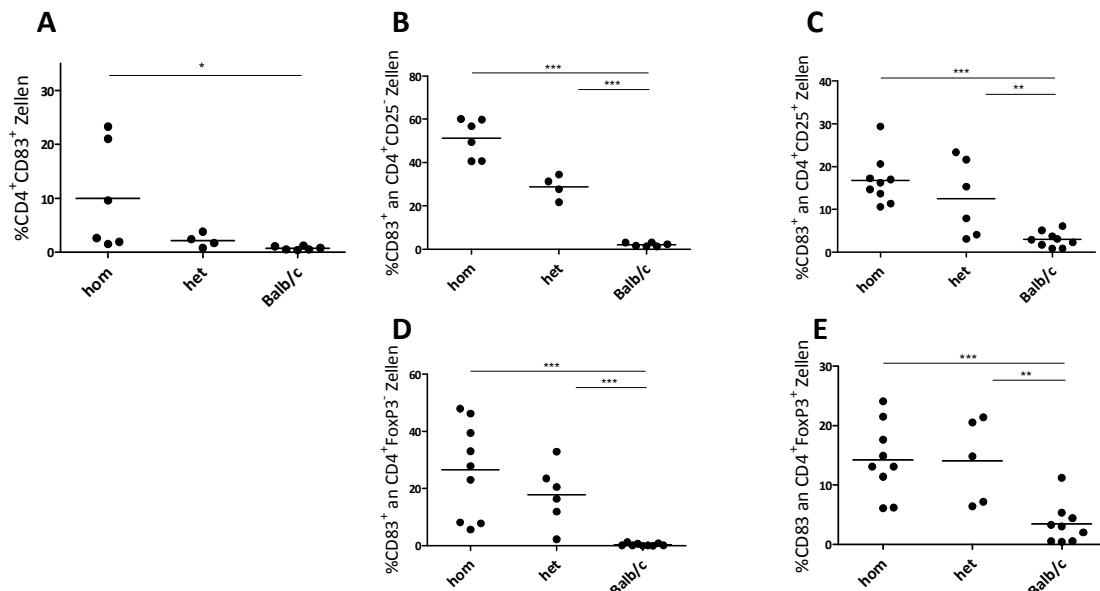


Abbildung 7: Anteil CD83⁺ T-Zellen im Thymus von CD4CD83 transgenen und Balb/c Mäusen. Aus CD4CD83 transgenen und aus nicht-transgenen Mäusen wurde der Thymus präpariert und der Anteil CD4⁺CD83⁺ Zellen **A** bzw. der Anteil CD83⁺ Zellen an den **B** CD4⁺CD25⁻, **C** CD4⁺CD25⁺ sowie den **D** CD4⁺FoxP3⁻ und **E** CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier, Daten von drei Experimenten wurden hier zusammengefasst. hom: homozygot; het: heterozygot. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt.

Dazu wurden aus CD4CD83 transgenen und nicht-transgenen Geschwistertieren Milz, mesenterische Lymphknoten (mLNs) und Thymus präpariert und der Anteil der CD83⁺ Zellen auf verschiedenen Immunzellen bestimmt. **Abbildung 7 A** zeigt, dass der Anteil CD4⁺CD83⁺ T-Zellen im Thymus von CD4CD83 homozygoten Mäusen bei durchschnittlich 10% lag, wobei derselbe Anteil in heterozygoten Tieren etwas darunter lag, dieser Anteil bei nicht-transgenen Tieren hingegen gegen Null ging. Auch in den Populationen der CD4⁺CD25⁻ (**Abbildung 7 B**), der CD4⁺CD25⁺ (**Abbildung 7 C**), der CD4⁺FoxP3⁻ (**Abbildung 7 D**) und der CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen (**Abbildung 7 E**) lag der Anteil CD83⁺ Zellen in homozygot und heterozygot transgenen Tieren signifikant über dem Anteil der CD83⁺ Zellen in denselben Populationen von nicht-transgenen Geschwistertieren.

Auch in der Milz konnte ein erhöhter Anteil CD83-exprimierender CD4⁺ T-Zellen detektiert

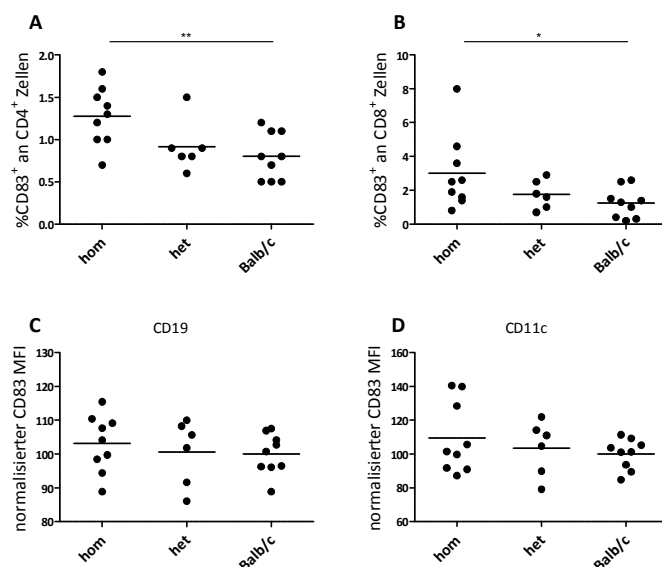


Abbildung 8: Anteil CD83⁺ T-Zellen in der Milz von CD4CD83 transgenen und Balb/c Mäusen. Aus CD4CD83 transgenen und aus Balb/c Mäusen wurde die Milz präpariert und der Anteil CD83⁺ Zellen an **A** CD4⁺ und **B** CD8⁺ T-Zellen, durchflusszytometrisch bestimmt. Die Expressionsstärke (MFI) von CD83 in der Population **C** der CD19⁺ B-Zellen und **D** CD11c⁺ DCs wurde ebenfalls durchflusszytometrisch bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. Daten von drei Experimenten wurden hier zusammengefasst. hom: homozygot; het: heterozygot. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt.

werden. Der Gesamtanteil dieser Zellen lag in den homozygot transgenen Tieren unter 2%, war damit aber signifikant höher als in nicht-transgenen Tieren, wie **Abbildung 8 A** zeigt. Ähnliches galt für den Anteil CD83⁺ Zellen in der CD8 Population. Auch hier konnten signifikant mehr CD83⁺ Zellen an den CD8⁺ T-Zellen in homozygot transgenen Mäusen gemessen werden, als in nicht-transgenen Kontrollen (**Abbildung 8 B**). Allerdings war hier sowohl der Anteil CD83⁺ T-Zellen in der CD4⁺ als auch der CD8⁺ T-Zellpopulation zwischen heterozygot transgen und nicht-transgen nicht unterschiedlich. Betrachtet man den Anteil CD83⁺ Zellen in CD19⁺ B-Zellen und CD11c⁺ DCs in der Milz transgener und nicht transgener Tiere, wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede gemessen. Auch die Expressionsstärke (MFI) von CD83 war hier nicht unterschiedlich (**Abbildung 8 C und D**).

In den mLKs konnte kein Unterschied im Anteil $CD83^+$ Zellen an $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen und auch nicht an $CD19^+$ B-Zellen oder $CD11c^+$ DCs im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt konnte auf mRNA Ebene eine $CD83$ Überexpression in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in der Milz von $CD4CD83$ transgenen Mäusen nachgewiesen werden. Auf Protein Ebene sah man im Thymus einen stark erhöhten Anteil $CD83^+$ Zellen in transgenen Tieren, weiter peripher in Milz und mLKs aber, nahm dieser Anteil ab. Da $CD83$ generell in naiven T- und B-Zellen nur gering exprimiert wird, wurde als nächstes untersucht, wie sich die $CD83$ Expression auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie auf $CD19^+$ B-Zellen nach Aktivierung verändert. Wie in **Abbildung 9 B** gezeigt, stieg der Anteil $CD83^+$ Zellen an den $CD4^+$ T-Zellen schon einen Tag nach Aktivierung (1 $\mu\text{g/ml}$ αCD3 , 1 $\mu\text{g/ml}$ αCD28 und 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS) in $CD4CD83$ transgenen aber

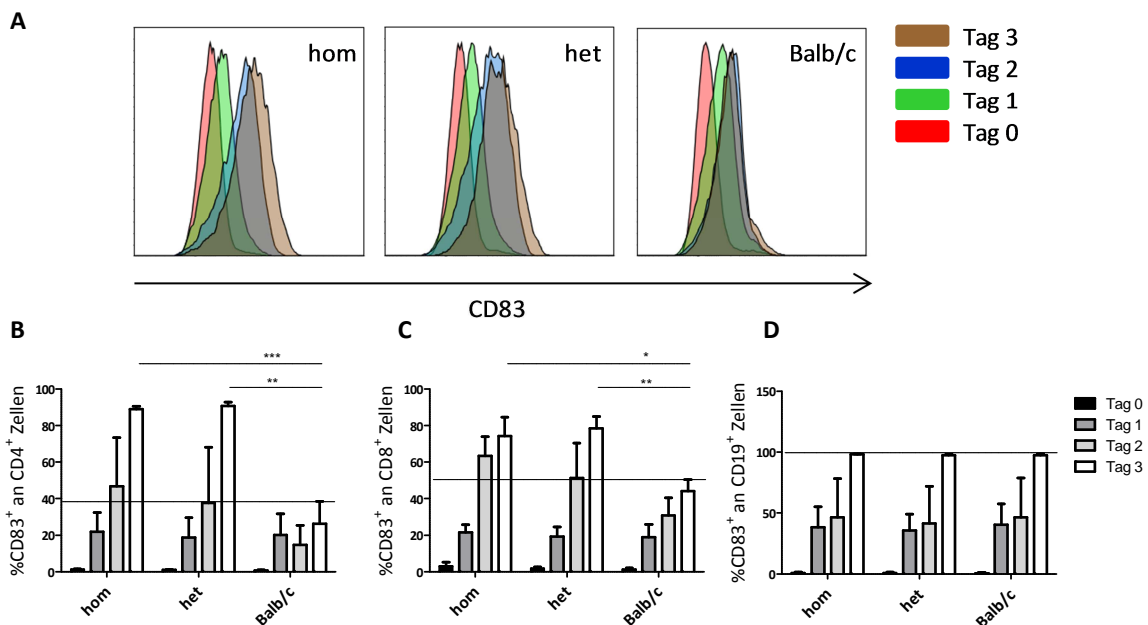


Abbildung 9: $CD83$ Expression in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, sowie $CD19^+$ B-Zellen aus der Milz von $CD4CD83$ transgenen und nicht-transgenen Mäusen nach *in vitro* Stimulation über einen Zeitraum von 3 Tagen. Gesamtmilzzellen wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ αCD3 , 1 $\mu\text{g/ml}$ αCD28 und 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert und die $CD83$ Expression an jedem Tag mittels Durchflusszytometrie bestimmt. **A** repräsentative Histogramme der $CD83$ Expression auf lebenden $CD4^+$ T-Zellen, **B – D** Zusammenfassung von drei Messungen mit je zwei (het) bis drei (Balb/c und hom) Tieren pro Gruppe. hom: homozygot; het: heterozygot. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt.

auch in den nicht-transgenen $CD4^+$ T-Zellen auf etwa 20% deutlich an. In den hetero- und homozygot $CD4CD83$ transgenen T-Zellen stieg die $CD83$ Expression an Tag 2 auf ca. 40% und an Tag 3 auf ca. 90% an, wohingegen kein weiterer Anstieg in der $CD83$ Expression in den nicht-transgenen $CD4^+$ T-Zellen gemessen werden konnte (**Abbildung 9 B**). Ganz ähnlich verhielt sich die $CD83$ Expression in $CD8^+$ T-Zellen. Zunächst sah man keinen deutlichen Unter-

schied in der Menge $CD8^+CD83^+$ Zellen (Tag 1), jedoch stieg der Anteil $CD83^+$ Zellen an den $CD8^+$ T-Zellen in den $CD4CD83$ transgenen T-Zellen bis auf knapp 80% an Tag 3, aber nur auf ca. 50% in den nicht-transgenen $CD8^+$ T-Zellen (**Abbildung 9 B**). In B-Zellen hingegen konnten keine Unterschiede im Anteil $CD19^+CD83^+$ B-Zellen nach Stimulation mit LPS gemessen werden (**Abbildung 9 C**). In **Abbildung 9 A** sieht man außerdem, dass es keine abgegrenzte Population $CD83^+$ Zellen gibt, sondern, dass vielmehr die gesamte Population $CD83$ hoch reguliert. Die $CD4CD83$ transgene Maus exprimierte schon in naiven T-Zellen signifikant mehr $CD83$ als nicht-transgene Geschwistertiere. Nach Zellaktivierung konnte außerdem ein noch deutlicherer Anstieg im Anteil der $CD83^+$ T-Zellen unter den $CD4^+$ T-Zellen detektiert werden.

4.1.2 Verteilung von verschiedenen Immunzellen in unterschiedlichen lymphatischen Organen von $CD4CD83$ transgenen Mäusen

Um herauszufinden, ob die Überexpression von $CD83$ in $CD4^+$ T-Zellen einen Einfluss auf die Verteilung naiver und regulatorischer $CD4^+$ T-Zellen sowie die Menge von $CD8^+$ T-Zellen hat, wurden die prozentualen Anteile dieser Populationen, aber auch die von $CD19^+$ B-Zellen und $CD11c^+$ Dendritischer Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen und mit Werten aus nicht-transgenen Mäusen verglichen. **Abbildung 10** zeigt, dass im Thymus von $CD4CD83$ homozygot transgenen Mäusen die prozentualen Anteile von $CD4^+$ (**Abbildung 10 A**) und $CD8^+$ T-Zellen (**Abbildung 10 B**) signifikant vermindert waren, der Anteil $CD4^+CD8^+$ doppelpositiver T-Zellen hingegen signifikant erhöht war (**Abbildung 10 C**). Tendenziell wurden diese Unter-

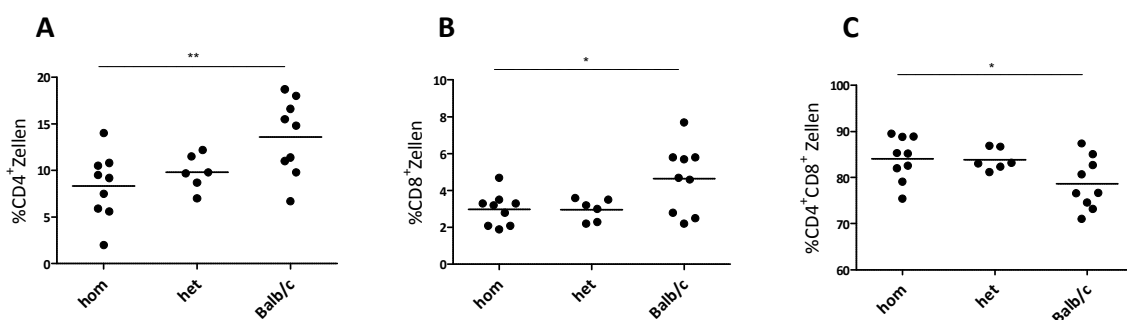


Abbildung 10: Verteilung von **A** $CD4^+$, **B** $CD8^+$ und **C** $CD4^+CD8^+$ T-Zellen im Thymus von homozygot und heterozygot transgenen $CD4CD83$ Mäusen sowie Balb/c Mäusen. Der prozentuale Anteil der verschiedenen T-Zellpopulationen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. Daten von drei Experimenten wurden hier zusammengefasst. hom: homozygot; het: heterozygot. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt.

schiede auch in den heterozygot transgenen Mäusen gemessen, diese waren allerdings statistisch nicht signifikant. T-Zellen reifen im Thymus und verlassen ihn als funktionelle naive T-

Zellen. Diese zirkulieren im Blut oder halten sich in sekundärlymphatischen Organen wie der Milz oder den Lymphknoten auf. Da im Thymus von CD4CD83 transgenen Mäusen ein deutlich verminderter Anteil $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen gegenüber nicht-transgenen Mäusen gemessen wurde, wurde als nächstes untersucht, wie hoch der Anteil an T-Zellen in der Milz und den mLKs war.

Weder in der Milz noch in den mLKs konnte ein signifikanter Unterschied im Anteil $CD4^+$ T-Zellen gemessen werden, wobei dieser Anteil in der Milz von CD4CD83 transgenen Mäusen tendenziell etwas geringer war als in nicht-transgenen Kontrollen. Der prozentuale Anteil an $CD8^+$ T-Zellen hingegen war in der Milz von CD4CD83 transgenen Mäusen signifikant vermindert, allerdings konnte in den mLKs dieser Unterschied nicht gemessen werden (Abbildung 11).

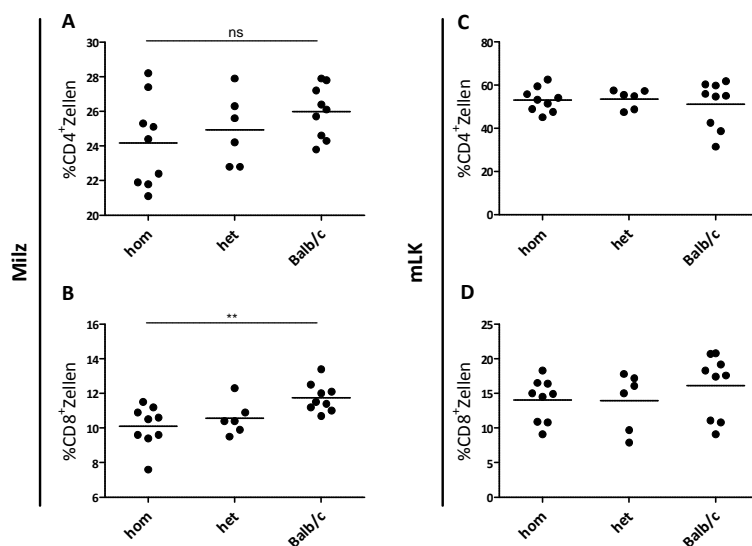


Abbildung 11: Verteilung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in der Milz (A + B) und den mLKs (C + D) von homozygot und heterozygot transgenen CD4CD83 Mäusen sowie Balb/c Mäusen. Der prozentuale Anteil der verschiedenen T-Zellpopulationen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. Daten von drei Experimenten wurden hier zusammengefasst. hom: homozygot; het: heterozygot. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt.

Weder der Anteil an $CD19^+$ B-Zellen, noch der Anteil an $CD11c^+$ Dendritischen Zellen war in der Milz und in den mLKs von CD4CD83 transgenen Mäusen signifikant unterschiedlich im

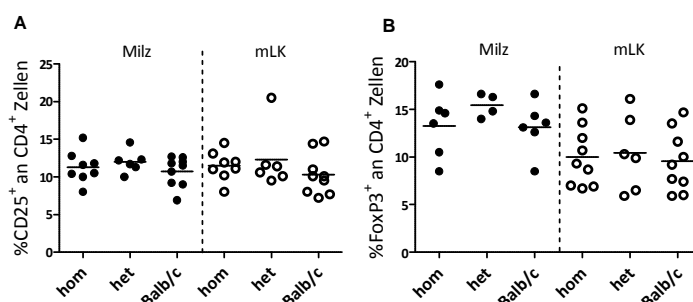


Abbildung 12: Verteilung von $CD4^+CD25^+$ A und $CD4^+FoxP3^+$ Tregs B in der Milz (links) und den mLKs (rechts) von homozygot und heterozygot transgenen CD4CD83 Mäusen sowie Balb/c Mäusen. Der prozentuale Anteil der verschiedenen T-Zellpopulationen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. Daten von drei Experimenten wurden hier zusammengefasst. hom: homozygot; het: heterozygot. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt.

Vergleich zu denselben Organen in nicht-transgenen Mäusen (Daten nicht gezeigt).

Auch die Population $CD4^+$ regulatorischer T-Zellen, in der Maus durch die Expression von CD25 und des Transkriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert, waren in der Milz und den mLKs von CD4CD83 transgenen und nicht-transgenen Mäusen annähernd gleich, im Schnitt bei ca. 10% (**Abbildung 12**).

4.1.3 Funktionelle Analyse der $CD4^+$ T Zellen aus CD4CD83 transgenen Mäusen *in vitro*

Das Hauptmerkmal von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen ist die Inhibition der Proliferation von aktivierten T-Zellen. $CD4^+CD25^-$ T-Zellen hingegen inhibieren gewöhnlich nicht. Allerdings konnte durch die retrovirale Überexpression von CD83 in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen ein regulatorischer Phänotyp induziert werden [41]. Daher wurde als nächstes untersucht, welchen Einfluss die Co-Kultur von $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, die aus CD4CD83 transgenen Mäusen isoliert wurden, auf die Proliferation von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen hat. Dazu wurden $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus einer Thy1.1⁺ Balb/c Maus als *Responder* Zellen mit einem Prolifera-

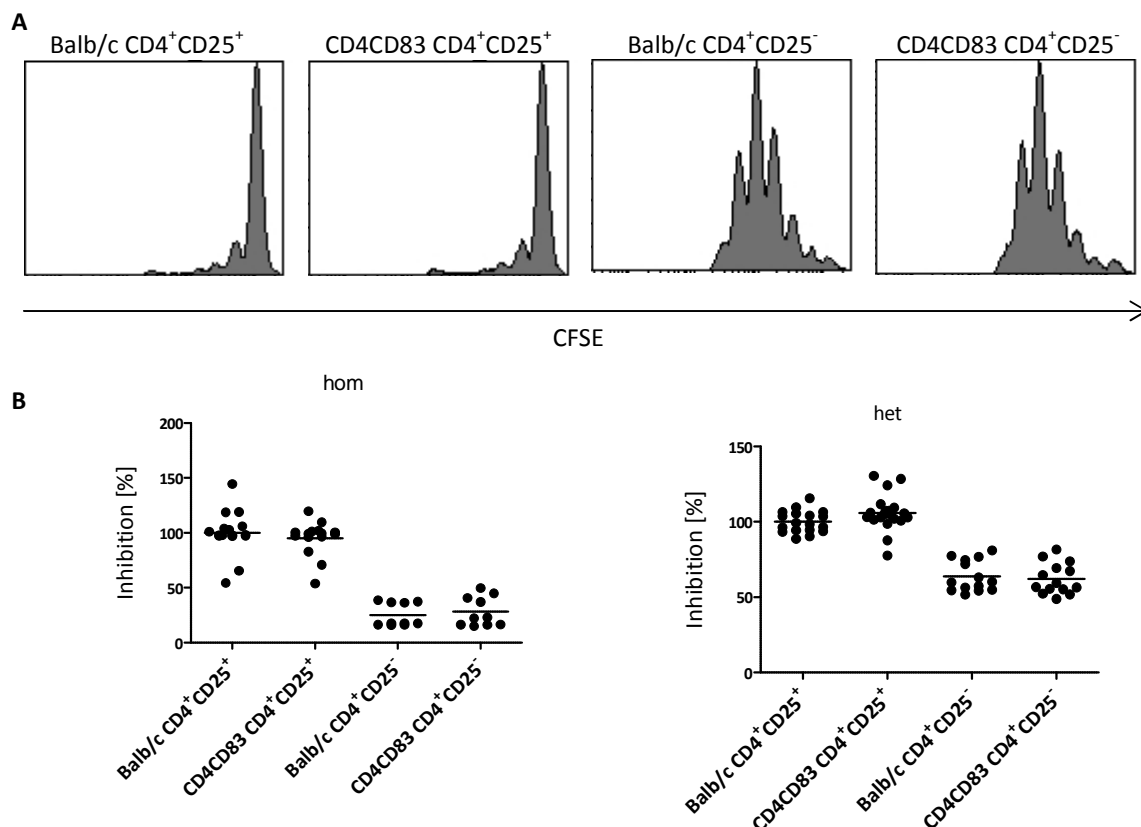


Abbildung 13: Analyse der inhibitorischen Eigenschaft von $CD4^+CD25^+$ Tregs und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen in Co-Kultur mit CFSE markierten wildtyp *Responder* Zellen. **A** zeigt repräsentative Histogramme einer Messung mit homozygoten und Balb/c T-Zellen, **B** alle Werte von insgesamt min. vier Experimenten zusammengefasst, wobei links die Werte aus homozygot transgenen CD4CD83 Mäusen und rechts solche aus heterozygot transgenen Mäusen jeweils im Vergleich zu Balb/c Mäusen dargestellt sind. hom: homozygot; het: heterozygot.

tionsfarbstoff (CFSE) angefärbt und in Gegenwart von regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^+$) oder naiven T-Zellen ($CD4^+CD25^-$) stimuliert und kultiviert.

Wie in **Abbildung 13** zu sehen ist, unterschied sich die inhibitorische Fähigkeit der $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen aus CD4CD83 heterozygot und homozygot transgenen Mäusen nicht von der, regulatorischer T-Zellen aus nicht-transgenen Kontrolltieren. Außerdem konnte durch die transgene T-Zell-spezifische Überexpression von CD83 der CD4CD83 transgenen Maus kein regulatorischer Phänotyp in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen induziert werden.

Zusätzlich zur inhibitorischen Fähigkeit wurde untersucht wie stark $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus CD4CD83 transgenen Mäusen nach *in vitro* Aktivierung im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollen proliferieren. **Abbildung 14** zeigt, dass $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen aus CD4CD83 transgenen Mäusen genauso wie Tregs aus nicht-transgenen Mäusen nach Stimulation *in vitro* nicht proliferierten. $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus CD4CD83 transgenen Mäusen hingegen proliferierten unter denselben Bedingungen sehr gut. Es konn-

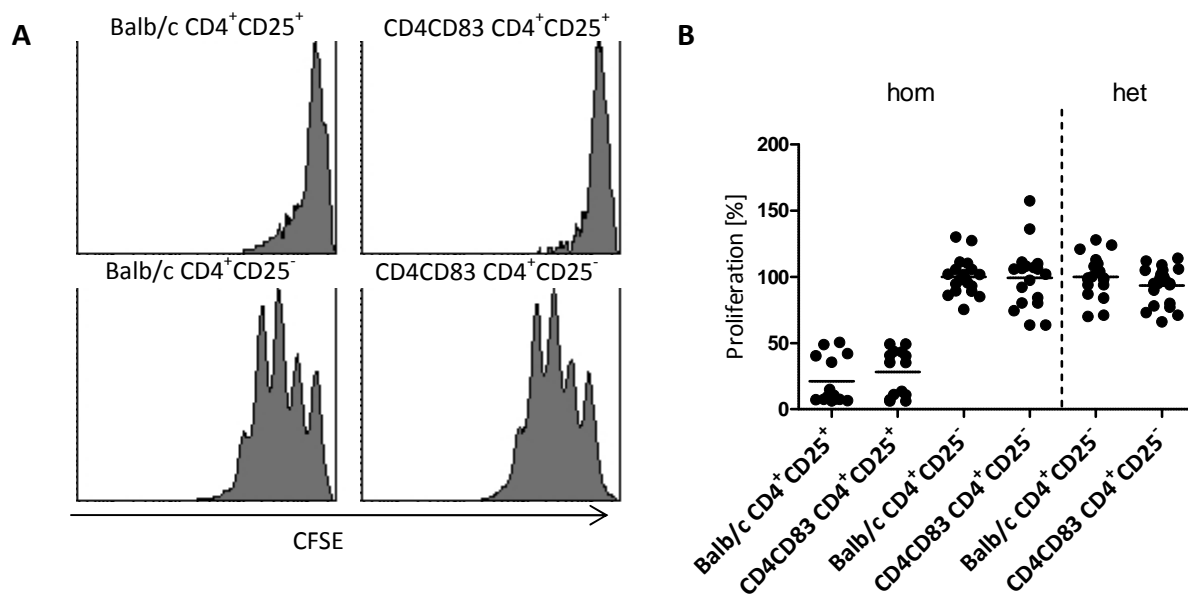


Abbildung 14: Analyse der proliferativen Eigenschaft von CFSE markierten $CD4^+CD25^+$ Tregs und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen. **A** zeigt repräsentative Histogramme einer Messung homozygoter T-Zellen im Vergleich zu Balb/c T-Zellen, **B** alle Werte aus vier Messungen zusammengefasst, wobei links die Werte aus homozygot (hom) transgenen und rechts solche aus heterozygot (het) transgenen CD4CD83 Mäusen dargestellt sind.

te allerdings kein Unterschied zwischen dem Proliferationsverhalten von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus CD4CD83 transgenen Mäusen und nicht-transgenen Mäusen nachgewiesen werden.

Die Funktion einer Immunzelle wird u.a. durch sezernierte Zytokine und Chemokine vermittelt. Diese haben unterschiedliche aber auch gegensätzliche Funktionen z.T. auf Zellen des eigenen Typs aber auch auf andere Zelltypen. $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ und IL17A sind pro-inflammatorische Zytokine, die beispielsweise neutrophile Granulozyten zum Ort der Ent-

zündung locken (IL17A), an der Aktivierung weiterer Immunzellen beteiligt sind (TNF α) oder für die Bekämpfung von Virus-infizierten Zellen und Tumorzellen wichtig sind (IFN γ). IL2 wird für das Überleben und die Proliferation von Effektorzellen benötigt und das Chemokin CCL3 induziert die Einwanderung von aktivierten CD8 $^{+}$ T-Zellen und B-Zellen zum Ort der Entzündung. IL10 hingegen wirkt anti-inflammatorisch und hemmt die pro-inflammatorischen Wirkungen anderer Zytokine.

In den Zellkulturüberständen der Proliferationsassays wurden die Konzentrationen der oben genannten Zytokine und Chemokine nach drei Tagen mittels Luminex-Technologie bestimmt.

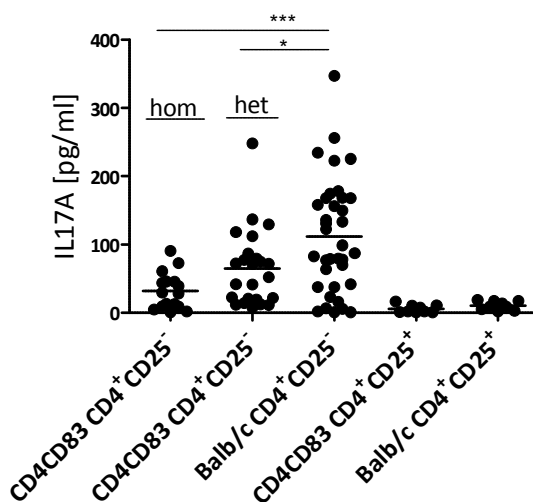


Abbildung 15: Analyse der sezernierten Zytokine im Zellkulturüberstand der Proliferationsassays. Aus jedem Well des Proliferationsassays wurden an Tag 3 vor der durchflusszytometrischen Bestimmung des Proliferationsverhaltens der T-Zellen Zellkulturüberstand entnommen und mittels Luminex Technologie auf den Gehalt von IL17A untersucht. hom: homozygot; het: heterozygot. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt.

Die Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF α nach dreitägiger Kultivierung von nicht-transgenen CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T-Zellen lag im Schnitt bei 500 pg/ml. Die Konzentrationen von IL2, CCL3 und IL10 war fast doppelt so hoch, ca. 1000 pg/ml. Man konnte aber, verglichen mit den wildtyp Proben, für die Sekretion keines dieser Zytokine einen signifikanten Unterschied von weder heterozygot noch homozygot CD4CD83 transgenen CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T-Zellen messen (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu lag die durchschnittliche Sekretion von IL17A aus nicht-transgenen T-Zellen bei etwa 150 pg/ml, die aus heterozygot und homozygot transgenen T-Zellen hingegen signifikant darunter (**Abbildung 15**). Die Sekretion all dieser Zytokine aus CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ regulatorischen T-Zellen lag, wie zu erwarten, im vernachlässigbaren Bereich.

4.1.4 Einfluss der T-Zell-spezifischen Überexpression von CD83 während einer Kontakt Hypersensitivitäts Reaktion *in vivo*

Die Überexpression von CD83 in T-Zellen aus der CD4CD83 transgenen Maus zeigte *in vitro* zwar weder einen Einfluss auf das Proliferations- noch auf das Inhibitionsverhalten der CD4 $^{+}$

T-Zellen im Vergleich zu nicht-transgenen Zellen, die IL17-Sekretion war aber deutlich vermindert. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss die T-Zell-spezifische Überexpression von CD83 in der CD4CD83 transgenen Maus auf das Verhalten und den Phänotyp dieser Zellen in einer DNFB-vermittelten Kontaktallergie *in vivo* hatte. Dazu wurden CD4CD83 transgenen Mäuse bzw. nicht-transgene Geschwistertiere mit 0,5% DNFB auf dem rasierten Rücken sensibilisiert und fünf Tage später an einem Ohr mit 0,3% DNFB behandelt. Nach zwei weiteren Tagen, wurde die Dicke des behandelten Ohres mit der Dicke desselben Ohres vor DNFB-Behandlung verglichen.

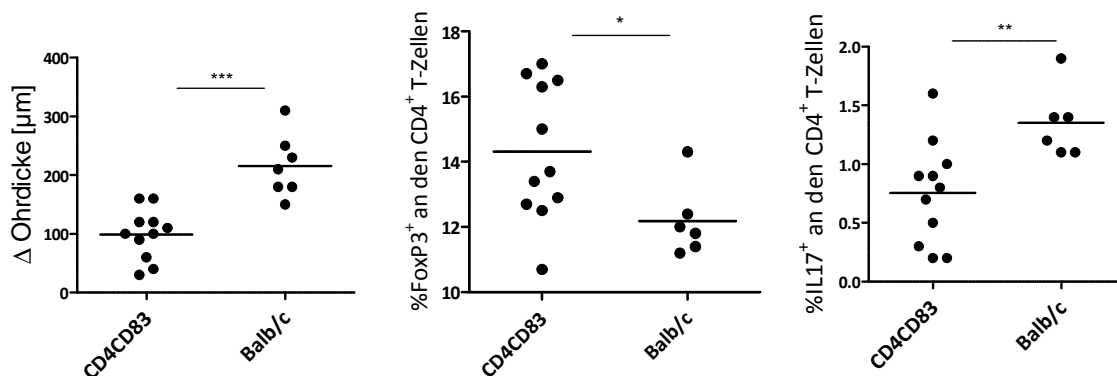


Abbildung 16: DNFB-vermittelte Kontaktallergie in homozygoten CD4CD83 transgenen Mäusen im Vergleich zu Balb/c Mäusen. **A** Messung der Ohrschwellung an Tag 2 nach DNFB-Behandlung des Ohres. **B** Prozentualer Anteil von FoxP3⁺ T-Zellen in der CD4⁺ T-Zellpopulation in den Ohr-drainierenden Lymphknoten auf Seite des DNFB-behandelten Ohres. **C** Prozentualer Anteil von IL17⁺ T-Zellen in der CD4⁺ T-Zellpopulation in den Ohr-drainierenden Lymphknoten auf Seite des DNFB-behandelten Ohres. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. Daten von zwei Experimenten wurden hier zusammengefasst. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt.

Wie in **Abbildung 16** gezeigt, war die Ohrschwellung der CD4CD83 transgenen Mäuse signifikant geringer als die der Kontrollen (**Abbildung 16 A**). Desweiteren wurde eine signifikant größere Menge FoxP3⁺ Zellen an den CD4⁺ T-Zellen in den Ohr-drainierenden Lymphknoten gemessen (**Abbildung 16 B**). In Übereinstimmung mit den *in vitro* Daten (**Abbildung 15**) konnte außerdem gezeigt werden, dass die IL17 sezernierenden CD4⁺ T-Zellen in den Ohr-drainierenden Lymphknoten der CD4CD83 transgenen Mäuse signifikant geringer vorhanden waren, als in Kontrolltieren (**Abbildung 16 C**).

Obwohl bei Zellen aus der CD4CD83 transgenen Maus *in vitro* keine Treg-Induktion beobachtet werden konnte, konnte *in vivo* gezeigt werden, dass eine Kontaktallergie einen milderen Verlauf nimmt, einhergehend mit einem signifikant erhöhtem Anteil an Tregs, und signifikant weniger IL17A-sezernierende CD4⁺ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten. Insgesamt

konnte somit insbesondere in der *in vivo* Situation ein immunmodulatorischer Effekt von CD83 in Richtung Toleranz gezeigt werden.

4.1.5 Generierung einer CD83 Knock Out Maus

Die Möglichkeiten den Einfluss und die Funktion eines Proteins nur über eine Überexpression des Proteins zu untersuchen sind begrenzt. Da beispielsweise bei der CD4CD83 transge-

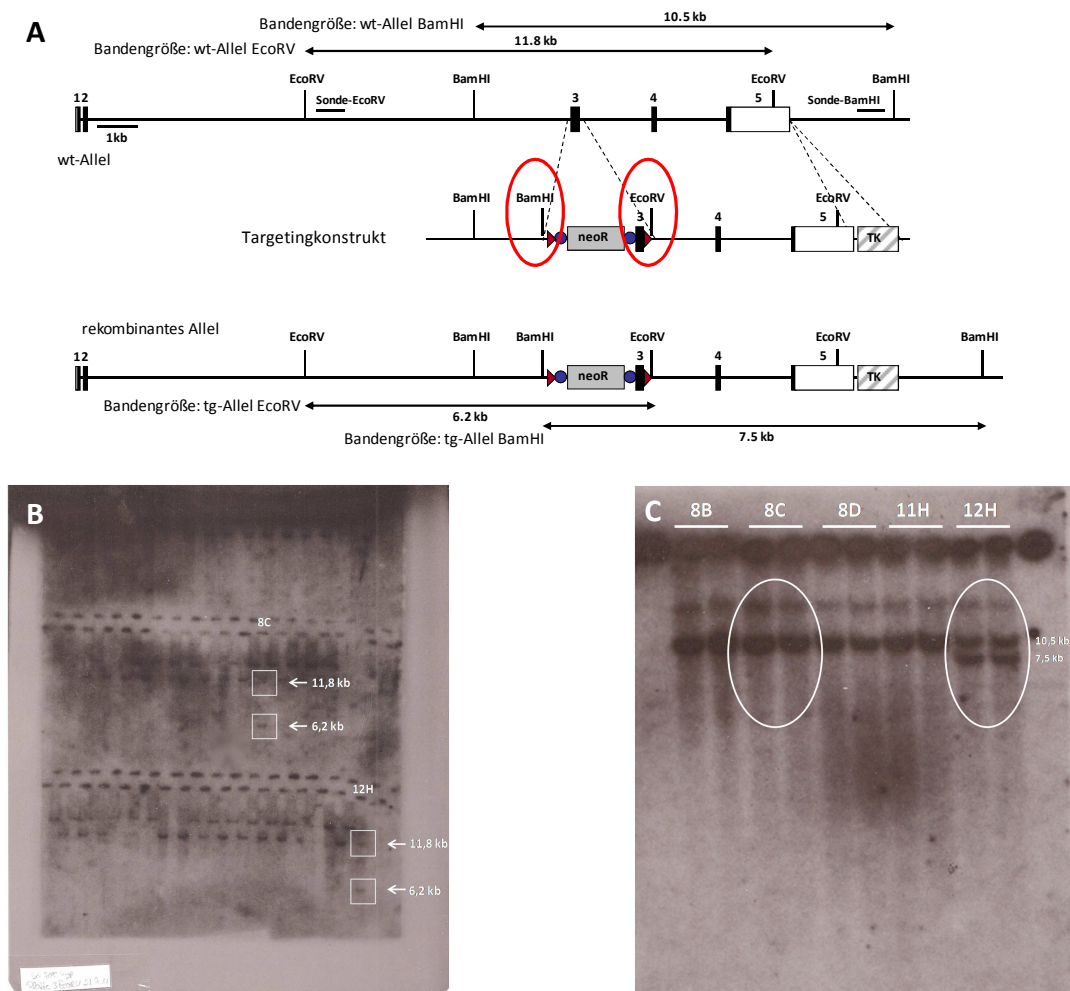


Abbildung 17: Southern Blot Screening von ca. 600 ES-Zellklonen, die das CD83-Targetingkonstrukt potenziell an der richtigen Stelle und in voller Länge ins Genom integriert haben. **A** Schematische Darstellung des wt und tg CD83 Allels mit Restriktionsschnittstellen und Bindungsstellen der benutzten Southern Blot Sonden. Neueingefügte Restriktionsschnittstellen sind rot umrandet **B** Southern Blot von 96 ES-Zellklonen, bei dem mit EcoRV geschnitten wurde, wt-Bande bei 11,8 kb, tg-Bande bei 6,2 kb. Quadrate markieren die Banden von positiven Klonen 8C und 12H. **C** Southern Blot der beiden positiven Klone 8C und 12H aus **B** und deren flankierende Klone 8B, 8D und 11H. Der Verdau mit BamHI lieferte eine wt-Bande bei 10,5 kb und eine tg-Bande bei 7,5 kb. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Dreieck: loxP Sequenz, Kreis: FLT-Sequenz

nen Maus nicht bekannt ist, wo genau im Genom das Transgen liegt, besteht immer eine geringe Möglichkeit, dass beobachtete Effekte nicht der Einfluss der CD83 Überexpression

waren, sondern auf strukturelle Änderungen im Genom während der Insertion des Transgens zurückzuführen sind.

Um die beobachteten Effekte auf reziproke Weise bestätigen zu können, und um die Analysen weiter zu vertiefen, wurde eine CD83Flox-Maus generiert, die später für die Zucht einer gewebespezifischen CD83 Knock Out Maus verwendet werden kann.

Zu diesem Zweck wurde im Vorfeld dieser Arbeit ein Targetingkonstrukt (pRapidFlirt-CD83targetvectorII, Wiebke Hansen) generiert, in dem Exon 3 von CD83 von LoxP Sites flankiert wird. Außerdem wurde für die spätere Selektion der transfizierten ES-Zellen eine Neomycin-Resistenz-Kassette (NeoR) flankiert von FRT-Schnittstellen inseriert (**Abbildung 17 A**).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden murine ES-Zellen mit diesem Targetingkonstrukt elektroporiert und selektiert. Von den so entstandenen einzelnen ES-Zellklonen wurden ca. 600 Klone mittels Southern Blot bezüglich der korrekten Integration analysiert. Zunächst wurden alle Klone mittels der Southern Blot Sonde-EcoR V gescreent, die spezifisch in der homologen Sequenz des wt Alles bindet, wodurch eine 11,8 kb wt-Bande im Southern Blot sichtbar wird. Durch die Einbringung einer zusätzlichen EcoR V-Schnittstelle in das Targetingkonstrukt, verminderte sich die Größe des DNA-Bereichs in dem die Sonde gebunden hat auf 6,2 kb (**Abbildung 17 A und B**).

Hierbei wurden zwei Klone (8C und 12H) identifiziert, bei denen zusätzlich zum wt-Allel bei 11,8 kb eine Bande bei 6,2 kb detektiert wurde (**Abbildung 17 B**). Durch einen zweiten Southern Blot, bei dem mit BamHI verdaut wurde und bei dem die Sonde-BamH I an der anderen Seite des Targetingkonstruktes gebunden hat, konnte der Klon H12 als positiv für das

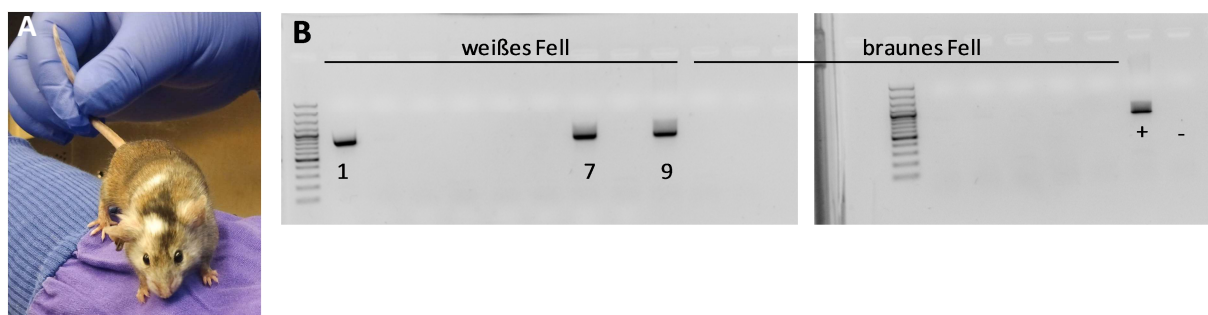


Abbildung 18: Chimäre und CD83-Flox Mäuse. **A** Foto eines chimären Männchens dessen Keimbahn aus CD83-Flox ES-Zellen aufgebaut wurde und das das Transgen an seine Nachkommen weiter vererbt. **B** Agarosegel mit PCR-Produkten eines Neomycin-Resistenz-Nachweises aus genomischer DNA von Nachkommen aller Chimäre. Zahlen zeigen die Mausnummer an. +: positiv Kontrolle, -: negativ Kontrolle.

Targetingkonstrukt, durch eine transgene Bande bei 7,5 kb zusätzlich zur 10,5 kb wt-Bande, validiert werden (**Abbildung 17 C**).

ES-Zellen dieses Klons wurden von Ronald Naumann (MPI Dresden) in Blastocysten von C57BL/6 Mäusen injiziert und drei daraus entstandene chimäre Männchen wurden im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen mit Balb/c Weibchen verpaart. Zunächst wurde untersucht, ob die genetische Veränderung keimbahngängig war d.h. das Transgen auf die nächste Generation weiter vererbt wurde.

Von den drei Chimären hatte, nach Verpaarung, ein Männchen keine Nachkommen, eines zeugte Nachkommen mit braunem Fell und eines Nachkommen mit weißem Fell. Da die injizierten ES-Zellen von einer Balb/c Maus stammten, wurde erwartet, dass ein Männchen dessen Keimbahn aus transgenen ES-Zellen aufgebaut wurde, weiße Nachkommen hat, wenn es mit einem Balb/c Weibchen verpaart wird. Die genomische DNA aller Nachkommen wurde mittels semiquantitativer PCR auf die Präsenz der NeoR-Kassette, die sich im Transgen befindet, untersucht. Von den neun Nachkommen des ersten Wurfs mit weißem Fell, hatten drei ein positives NeoR Signal, was bedeutet, dass das chimäre Vartier das Transgen vererbt hat. Von den Nachkommen mit braunem Fell hatte keines ein positives NeoR Signal (**Abbildung 18**).

Als nächstes wurden zwei der nun entstandenen CD83Flox Mäuse homozygot zu einer CD83fl/fl Maus verpaart. Diese Maus wurde anschließend mit einer Rosa-FLP-Maus verpaart,

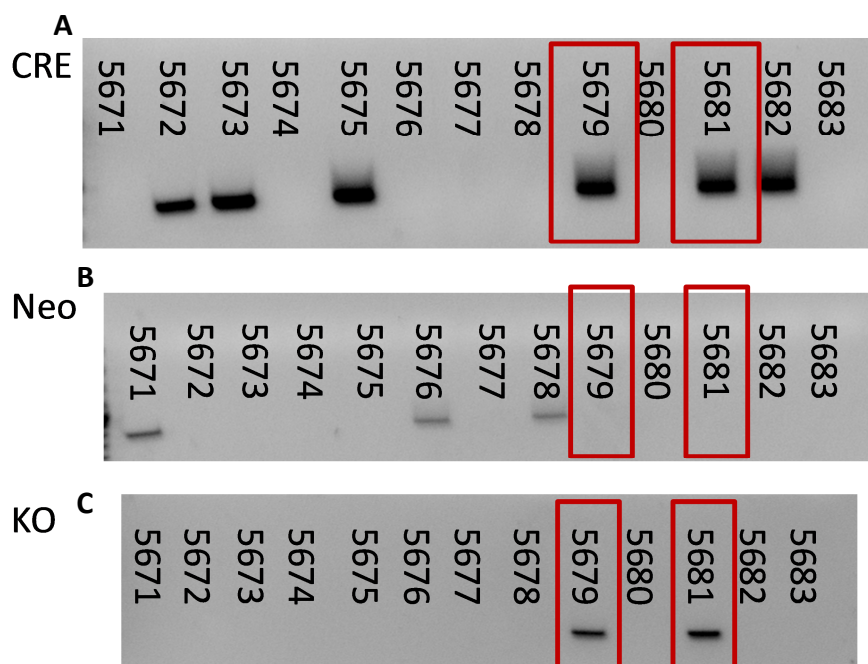


Abbildung 19: Agarosegele mit PCR Produkten eines spezifischen Nachweises von **A** Cre, **B** NeoR, **C** KO aus CD83fl x CMV-Cre Mäusen. In **C** ist nur der Bereich um ca. 500 bp gezeigt. Zahlen zeigen die Mausnummern an, rote Kästchen, die Mausnummer und Banden von CD83KO Mäusen.

um die NeoR-Kassette herauszuschneiden. Die Nachkommen dieser Verpaarung können dann mit einer gewebespezifischen Cre-Maus verpaart werden, um eine gewebespezifischen CD83KO Maus zu erhalten.

Um vorab zu testen, ob der geplante Knock Out *in vivo* funktioniert, wurde die CD83fl/wt Maus allogot mit einer CMV-Cre Maus verpaart, die Cre in allen Geweben unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. Mittels spezifischer Primer wurde der Genotyp der Nachkommen dieser Verpaarung untersucht (**Abbildung 19**). Als erstes wurde untersucht, welche Mäuse die Cre-Rekombinase exprimierten, also die Kandidaten, bei denen ein Knock Out überhaupt möglich war (**Abbildung 19 A**). Dann wurde überprüft, ob das NeoR-Signal noch nachweisbar war, da die NeoR-Kassette innerhalb der LoxP-Schnittstellen im Transgen liegt (**Abbildung 19 B**). Hier konnten zwei Mäuse identifiziert (Mausnummer: 5679 und 5681) werden, die die Cre-Rekombinase exprimierten, aber kein NeoR-Signal mehr haben. Als Bestätigung wurden außerdem Primer verwendet, die Exon 3 flankieren und im rekombinierten Fall eine Bande bei 534 bp und im nicht rekombinierten Fall eine Bande bei 3,5 kb zeigten (**Abbildung 19 C**). Mit diesen „KO“-Primern konnte schließlich bestätigt werden, dass die Mäuse 5679 und 5681 ein rekombiniertes Allel des Transgens tragen.

Als letztes wurde untersucht, ob die CD83 Expression auf mRNA und Protein Ebene in CD83fl/fl x CMV-Cre Tieren tatsächlich nicht mehr detektiert werden konnte. Dazu wurden die Milz und die mesenterischen Lymphknoten aus nicht-transgenen Geschwistertieren (wt), heterozygoten CD83KO Mäusen und aus einer homozygoten CD83KO Maus präpariert. Milzzellen und Lymphknotenzellen wurden für 24 h mit 1 µg/ml αCD3 und 1 µg/ml LPS stimuliert, um die CD83 Expression in T- und B-Zellen zu induzieren. Mittels Durchflusszytometrie wurde die CD83 Expression auf CD19⁺ B-Zellen gemessen. Zusätzlich wurde die CD83 Expression auf CD4⁺ T-Zellen gemessen, um abschätzen zu können, wie deutlich sich die CD83 Expression von CD83-defizienten CD4⁺ T-Zellen von wt CD4⁺ T-Zellen unterscheidet. Wie in **Abbildung 20 A** und **B** gezeigt ist, waren in den wt-Mäusen durchschnittlich 15% der Milzzellen CD19⁺CD83⁺, wohin gegen nur ca. 5% der heterozygoten CD83KO Mäuse CD19⁺CD83⁺ waren und nur 0,2% in der homozygoten CD83KO Maus. In den mLKs wurden durchschnittlich 10% CD19⁺CD83⁺ B-Zellen in den wt Tieren, ca. 3% in den heterozygoten Knock Out Tieren und 0,2% in der homozygoten Knock Out Maus gemessen. Da nur eine homozygote Maus zu Verfügung stand, konnte nicht berechnet werden, ob es durch den Knock Out zu einer signifikanten Verminderung von CD83⁺ Zellen kommt. Da aber schon der heterozygote

Knock Out eine signifikante Reduktion von CD83 erzielte und der Wert, der homozygoten Knock Out Maus nochmal deutlich darunter lag, kann dieses Ergebnis als starker Hinweis darauf angesehen werden, dass die CD83^{fl/fl} Maus erfolgreich für einen CD83KO eingesetzt werden kann. Die prozentualen Anteile an CD4⁺CD83⁺ T-Zellen lagen um 1% und damit deutlich unter denen von CD19⁺CD83⁺ B-Zellen. Trotzdem konnte auch hier in der Milz eine signifikante Verminderung von CD4⁺CD83⁺ T-Zellen gemessen werden, die in den mesenterischen Lymphknoten tendenziell noch zu erkennen war. Außerdem konnte in, α CD3 und LPS stimulierten, Milz- und Lymphknoten zellen mittels semiquantitativer PCR kein CD83 mRNA Signal in der CD83KO Probe mehr detektiert werden (**Abbildung 20 C**). Auch diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass mit der CD83^{fl/fl} Maus CD83-Exon3 erfolgreich herausgeschnitten werden kann und kein funktionelles CD83 Molekül mehr gebildet wird.

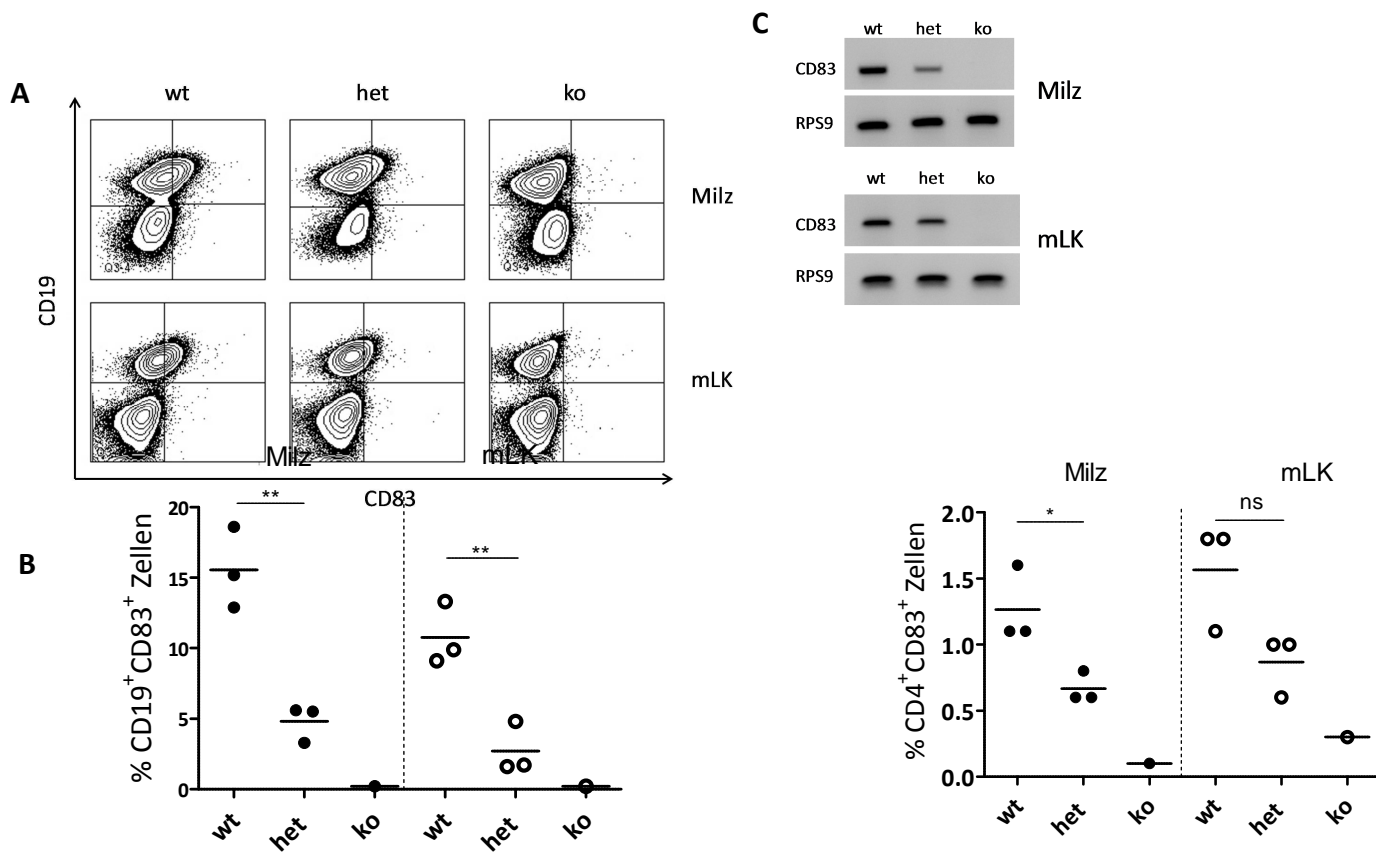


Abbildung 20: CD83 Expression in Gesamtmilz und -mLKs nach 24 h Stimulation mit 1 µg/ml α CD3 und 1 µg/ml LPS. **A** CD83 Proteinexpression als repräsentative Konturplots, analysiert mittels Durchflusszytometrie **B** Alle Werte der CD83 Proteinexpression als Dotplot, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. **C** CD83 mRNA Expression in aktivierten Milz- und Lymphknoten zellen. Gezeigt ist ein Versuch mit je drei wt und het Mäusen und einer ko Maus, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt. wt: wildtyp; het: heterozygoter KO; ko: homozygoter KO.

4.2 Einfluss der Überexpression von miR183 auf CD4⁺ T-Zellen

4.2.1 miR183-Expression in naiven und aktivierten CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Der Phänotyp und die Funktion von CD4⁺ T-Zellen werden durch miRNAs beeinflusst. Welche miRNA dies im Einzelnen vermitteln ist allerdings noch nicht völlig geklärt. Um herauszufinden, welche miRNAs spezifisch in regulatorischen T-Zellen und Effektor T-Zellen exprimiert werden, wurden durch die Firma Febit Biomed GmbH (Heidelberg) miRNA-Microarrays von naiven und aktivierten polyklonalen CD4⁺CD25⁺ sowie von Antigen-spezifischen regulatorischen T-Zellen mit solchen von CD4⁺CD25⁻ naiven und aktivierten T-Zellen verglichen. Dabei wurden 22 miRNAs identifiziert, die zwischen diesen Gruppen differenziell exprimiert wurden, u.a. miR183. Deren Expression wurde in naiven und aktivierten nTregs mit der miR183-Expression von naiven und aktivierten T-Effektorzellen mittels qPCR verglichen.

In naiven CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus Balb/c Mäusen war die miR183-Expression tendenziell et-

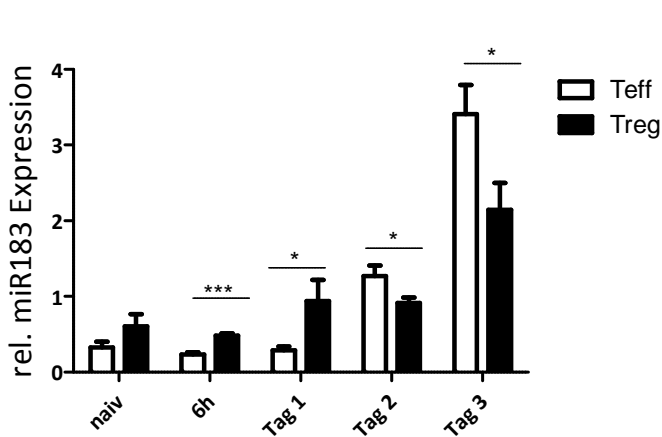
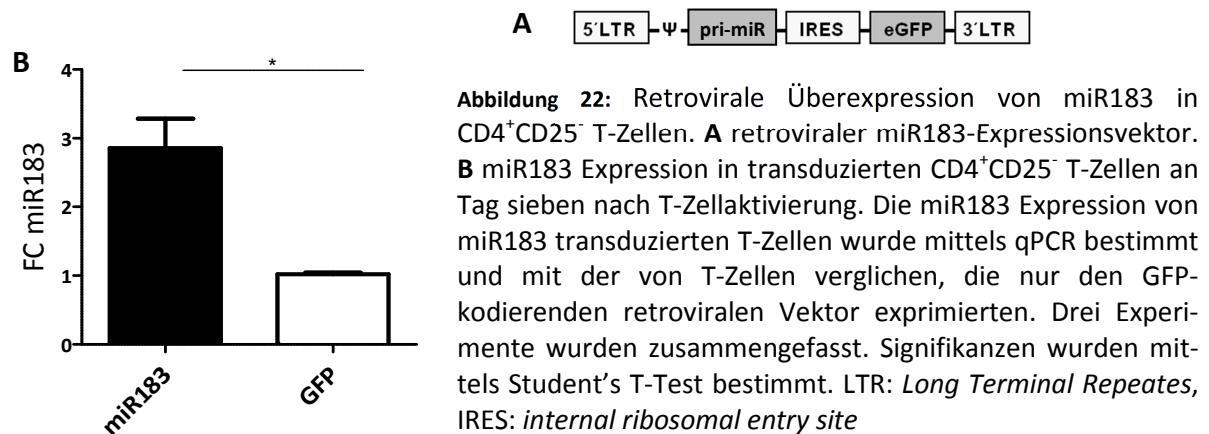


Abbildung 21: Messung der miR183 Expression mittels qPCR. CD4⁺CD25⁺ Tregs und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden aus Balb/c Mäusen isoliert, sortiert und für drei Tage 1 µg/ml αCD3 und 1 µg/ml αCD28 in der Gegenwart von 50 U/ml IL2 stimuliert. An den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen geerntet, RNA präpariert und diese in cDNA umgeschrieben, die der qPCR als Template diente. Drei Experimente wurden zusammengefasst. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt.

was höher als in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus denselben Mäusen. Nach zwei Tagen Aktivierung mit 1 µg/ml αCD3 und 1 µg/ml αCD28 in der Gegenwart von 50 U/ml IL2 hingegen exprimierten die CD4⁺CD25⁻ T-Zellen signifikant mehr miR183 als CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (**Abbildung 21**). Im naiven Zustand und bis zu 24 Stunden nach T-Zell Aktivierung war die miR183-Expression in T-Zellen mit regulatorischem Phänotyp höher als in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, danach allerdings stieg die miR183-Expression in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aber deutlich stärker an als in regulatorischen T-Zellen und überstieg diese deutlich. Dies weist darauf hin, dass miR183 in regulatorischen T-Zellen, aber auch in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach T-Zell-Aktivierung eine funktionelle Rolle zu spielen scheint.

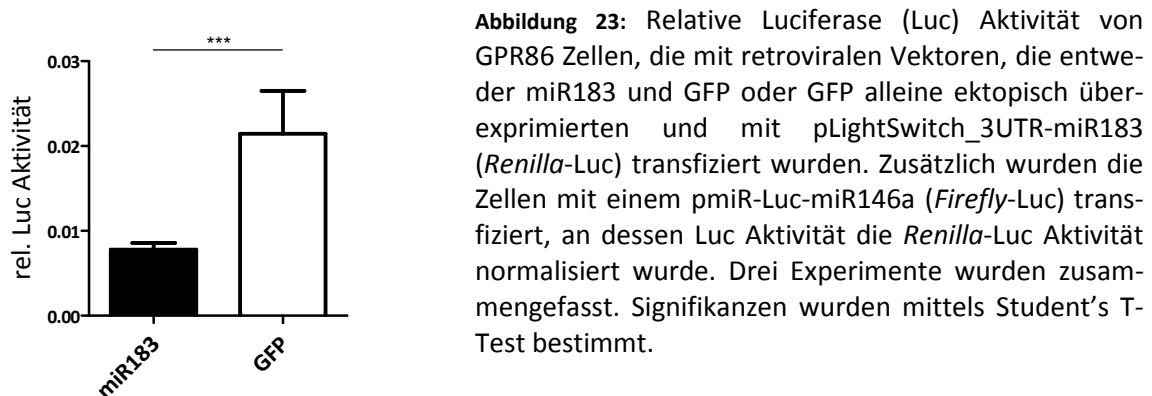
4.2.2 Retrovirale Überexpression von miR183 in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen

Um zu untersuchen, welche Funktion miR183 in CD4⁺ T-Zellen spielt, sollte miR183 in CD4⁺ T-Zellen mittels retroviralem Gentransfers überexprimiert werden (3.3). Dazu wurde die *mature* miR183 Sequenz von beiden Seiten von ca. 200 bp genomischer Sequenz flankiert, in



einen retroviralen Expressionsvektor kloniert, der GFP als Reporter mit exprimiert (**Abbildung 22 A**). Mit diesem Vektor wurde die Verpackungszelllinie GPE86 transfiziert und es wurden virale Partikel generiert, mit denen aktivierte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen transduziert wurden. Als Kontrolle dienten retrovirale Partikel, die nur GFP alleine überexprimierten. **Abbildung 22** zeigt, dass mittels dieser viralen Partikel eine ca. dreifache miR183-Überexpression gegenüber T-Zellen erzielt werden konnte, die mit viralen Partikeln transduziert wurden, die nur GFP überexprimierten.

Um nun zu zeigen, dass die miR183, die in den transduzierten T-Zellen viral überexprimiert wurde, auch biologisch funktionell war, wurde in einem Luciferase Assay untersucht, ob die gebildete miR183 an ihre Erkennungssequenz in einem mRNA Molekül bindet und es zur



Hemmung der Translation kommt. Dazu wurde der kommerzieller Vektor pLightSwitch_3UTR-miR183 benutzt, der das Luciferase Gen kodiert. Am 3'UTR der Luciferase-

mRNA wurde die Erkennungssequenz von miR183 angehängt, so dass es durch die Bindung von miR183 zu einer verschlechterten Luciferase Expression kommen müsste, die durch die Gabe von Luciferin und dessen Umsetzung und der daraus folgenden Abstrahlung von Photonen messbar gemacht werden kann.

Wie man in **Abbildung 23** sieht, wurde eine signifikant verminderte Luciferase Aktivität in den Zellen, die miR183-überexprimierten, gemessen im Vergleich zu GFP-überexprimierenden Zellen. Dies zeigt, dass miR183 mit diesem retroviralem System biologisch funktionell in CD4⁺ T-Zellen überexprimiert werden konnte. Somit stand ein System zur Verfügung, mit dem der Einfluss der miR183 auf den T-Zellphänotyp untersucht werden kann.

4.2.3 Funktionelle Charakterisierung der miR183-überexprimierenden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen *in vitro*

Zunächst wurde untersucht, ob CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durch die Überexpression von miR183 einen regulatorischen Phänotyp erhalten. Dazu wurde die Proteinexpression von verschiedenen Treg-assoziierten Molekülen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

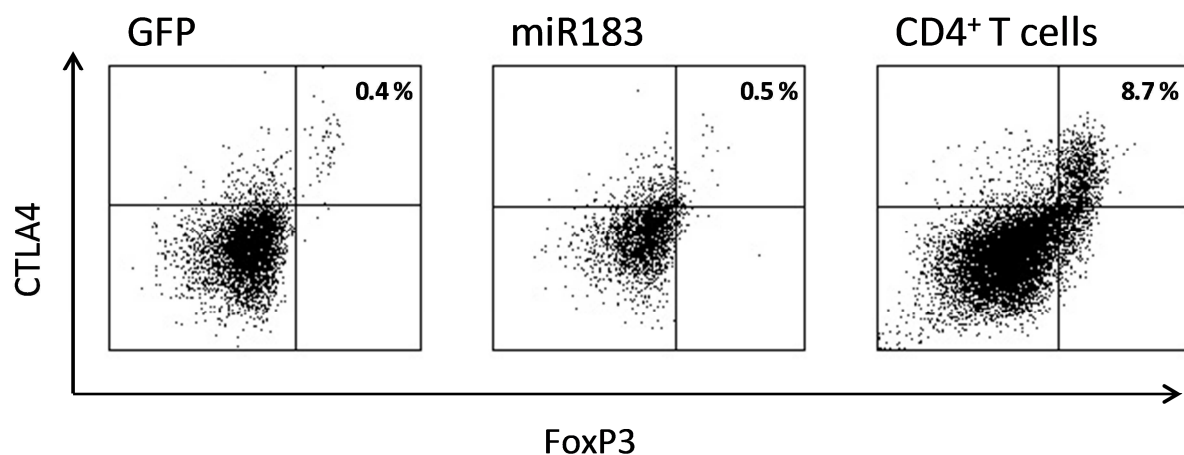


Abbildung 24: Repräsentative Dotplots einer durchflusszytometrischen Messung von CTLA4 und FoxP3 in miR183 überexprimierenden T-Zellen, den GFP Kontrollvektor-exprimierenden T-Zellen oder frisch isolierten Milzzellen einer Balb/c Maus. Die angegebenen prozentualen Anteile beziehen sich auf die FoxP3⁺CTLA4⁺ T-Zellen aus der CD4⁺GFP⁺ Population bzw. im Fall der frisch isolierten Milzzellen nur aus der CD4⁺ Population.

Wie in **Abbildung 24** exemplarisch dargestellt, konnte durch die miR183-Überexpression weder die Expression von FoxP3, des wichtigsten Transkriptionsfaktors von regulatorischen T-Zellen in der Maus, noch von CTLA4, das mit regulatorischen T-Zellen in Zusammenhang gebracht wird, induziert werden.

Das wichtigste funktionelle Merkmal von regulatorischen T-Zellen ist es, die Proliferation von Effektorzellen zu hemmen. Um nun zu testen, ob die Überexpression von miR183 in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zur Induktion eines regulatorischen Phänotyps führte, wurde ein Inhibitionsassay durchgeführt.

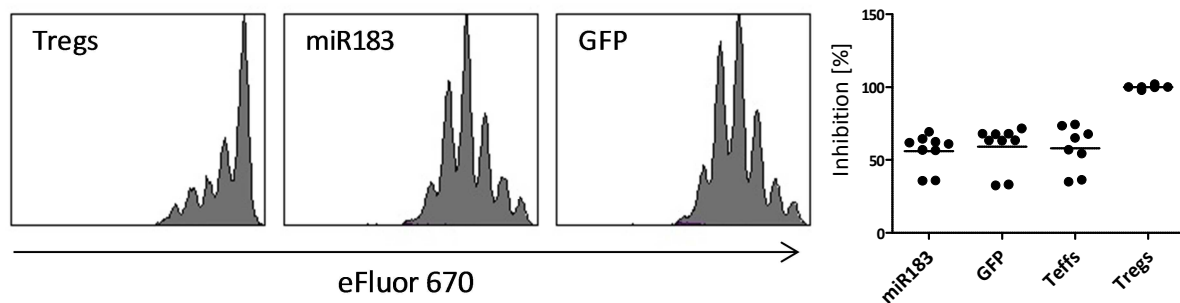


Abbildung 25: Analyse der inhibitorischen Eigenschaft von frisch isolierten $CD4^+CD25^+$ Tregs bzw. naiven T-Zellen und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, die entweder miR183 oder GFP retroviral überexprimierten in Co-Kultur mit eFluor670 markierten Balb/c *Responder* Zellen. **A** zeigt repräsentative Histogramme einer Messung, **B** alle Werte aus vier Experimenten zusammengefasst.

Abbildung 25 zeigt, dass durch die miR183-Überexpression in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen kein suppressiver Phänotyp induziert wurde, da sich die Proliferationsrate der *Responder* T-Zellen in Co-Kultur mit miR183-überexprimierenden T-Zellen nicht von der Proliferationsrate von *Responder* T-Zellen in Co-Kultur mit T-Zellen, die den GFP-Kontrollvektor exprimierten unterschied.

Die Expressionsanalyse von miR183 (**Abbildung 21**) zeigte, dass die miR183-Expression nach

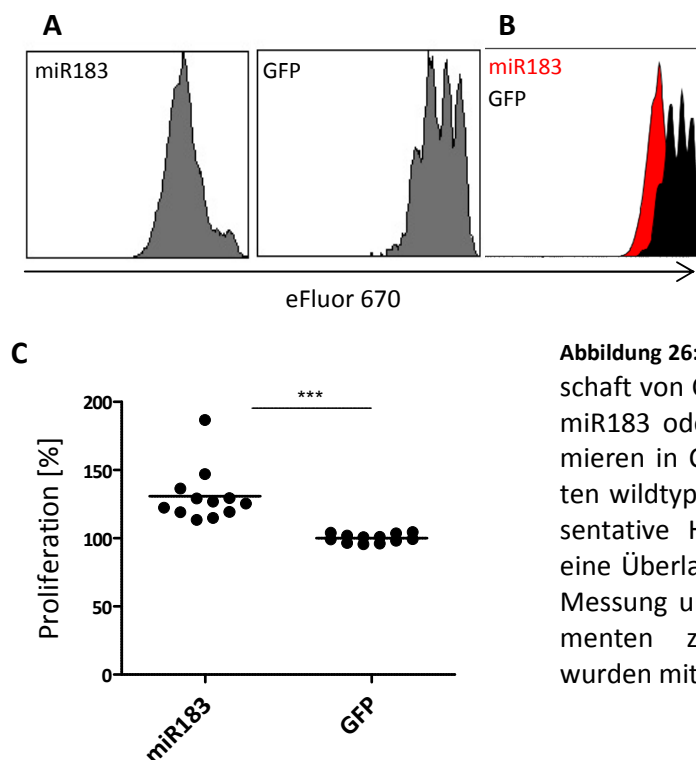


Abbildung 26: Analyse der proliferativen Eigenschaft von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, die entweder miR183 oder den GFP-Kontrollvektor exprimieren in Co-Kultur mit eFluor670 markierten wildtyp *Responder* Zellen. **A** zeigt repräsentative Histogramme einer Messung, **B** eine Überlagerung der miR183 und der GFP Messung und **C** alle Werte aus vier Experimenten zusammengefasst. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt

T-Zellaktivierung auch in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen stark ansteigt, so dass vermutet werden kann, dass miR183 auch in T-Effektorzellen eine wichtige Rolle spielt. Deswegen wurde als nächstes untersucht, welchen Einfluss die miR183-Überexpression auf die Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen hat. Im Vergleich zu den nur GFP-überexprimierenden Kontrollzellen proliferierten die miR183-überexprimierenden T-Zellen *in vitro* nach Stimulation signifikant schneller wie in **Abbildung 26** gezeigt ist.

Da eine verstärkte Proliferation in der Regel mit einem erhöhten Aktivierungsstatus der T-Zellen einhergeht, wurde als nächstes die Expression von T-Zellaktivierungsmarkern über-

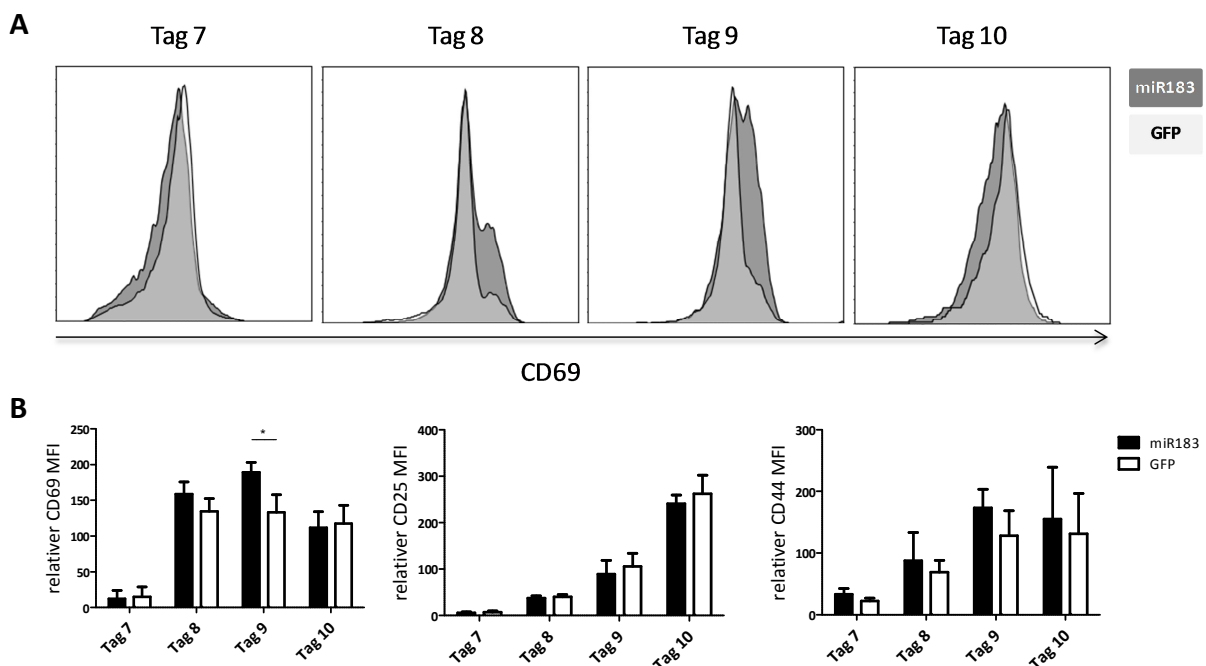


Abbildung 27: CD69, CD25, und CD44 Expression auf miR183 bzw. GFP-überexprimierenden T-Zellen. An Tag 7 nach der primären T-Zellaktivierung, wurden $CD4^+GFP^+$ T-Zellen sortiert und mit $\alpha CD3$ und $\alpha CD28$ *in vitro* re-stimuliert. **A** Überlagerte Histogramme einer repräsentativen Messung von CD69. Die Zeitpunkte der Messung sind jeweils angegeben. **B** Zusammenfassung aller Werte, CD69 drei Messungen, CD25 und CD44 zwei Messungen. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt.

prüft. An Tag 7 nach T-Zellaktivierung wurden miR183-überexprimierende T-Zellen anhand ihrer GFP-Expression sortiert und über einen Zeitraum von drei Tagen mit $0,75 \mu g/ml$ immobilisiertem $\alpha CD3$ und $1 \mu g/ml$ löslichem $\alpha CD28$ restimuliert. An den in **Abbildung 27** angegebenen Zeitpunkten wurde die Oberflächenexpression von CD44, CD25 und CD69 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Wie in **Abbildung 27** dargestellt, stieg die Expression von CD69 auf der Oberfläche von miR183-überexprimierenden T-Zellen signifikant schneller an, als auf den GFP-Kontrollvektor exprimierenden T-Zellen. Die Expression von CD25 blieb hingegen durch die miR183-Überexpression unverändert. Die Expression von CD44 war in den

miR183-überexprimierenden Zellen auch tendenziell höher als auf den mit dem GFP-Kontrollvektor transduzierten Zellen.

Ein wichtiges Charakteristikum einer aktivierten T-Zelle ist die Zusammensetzung von sezernierten Zytokinen. So schütten aktivierte T-Effektorzellen pro-inflammatorische, regulatorische T-Zellen hingegen anti-inflammatorische Zytokine aus. Daher wurde als nächstes mittels Luminex Technologie untersucht, ob sich die Menge sezernierter Zytokine aus miR183-überexprimierenden T-Zellen von der Menge sezernierter Zytokine aus GFP-überexprimierenden Kontrollen unterscheidet.

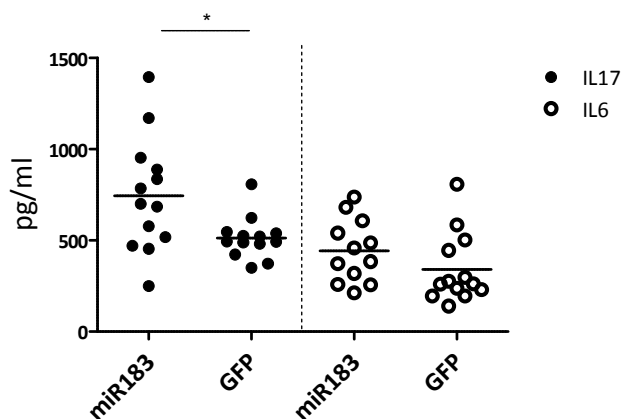


Abbildung 28: Analyse der sezernierten Zytokine im Zellkulturüberstand der Proliferationsassays. Aus jedem Well des Proliferationsassays wurden an Tag 3 vor der durchflusszytometrischen Bestimmung des Proliferationsverhaltens der T-Zellen Zellkulturüberstand entnommen und mittels Luminex Technologie auf den Gehalt an den angezeigten Zytokinen untersucht. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt.

Wie aus **Abbildung 28** hervorgeht, konnte eine signifikant erhöhte Menge IL17 in den Zellkulturüberständen der miR183-überexprimierenden Zellen verglichen mit GFP-überexprimierenden Kontrollen gemessen werden. Auch die Sekretion von IL6, das die IL17 Sekretion indirekt bedingt, ist in den miR183-überexprimierenden T-Zellüberständen leicht, allerdings nicht signifikant erhöht. Die Mengen IL10, IL2, IFN γ und TNF α waren nicht verändert (Daten nicht gezeigt).

4.2.4 Einfluss von miR183-überexprimierenden T-Zellen auf ein murines Autoimmundiabetes Modell

Die funktionellen *in vitro* Analysen haben ergeben, dass die miR183-überexprimierenden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen besser proliferierten und den Aktivierungsmarker CD69 schneller hoch regulieren als GFP-überexprimierende Kontrollen. Um zu untersuchen, ob dieser Phänotyp auch *in vivo* bestand hat, wurde ein Antigen-spezifisches Autoimmundiabetes Modell in der Maus verwendet. Die dazu verwendeten doppeltransgenen INS-HA x RAG2KO Mäuse exprimieren das Modellantigen Hämagglutinin (HA) auf den Insulin-produzierenden Zellen im Pankreas. Außerdem haben sie keine funktionellen B- oder T-Zellen, da diese Mäuse defizi-

men haben. Der Schwellenwert, ab dem eine Maus als diabetisch eingestuft wird, liegt bei

200 mg/dl Blutglukose. Da die miR183-überexprimierenden T-Zellen *in vitro* schneller proliferierten, könnte das der Grund für einen schnelleren Krankheitsbeginn sein. Wie in **Abbildung 29 C** gezeigt ist, konnten tatsächlich eine signifikant größere Menge CD4⁺Thy1.1⁺ T-Zellen in den mLKs von INS-HA x RAG2KO Mäusen, die miR183-überexprimierende T-Zellen bekommen haben, gemessen werden als in Mäusen, denen GFP exprimierende Kontrollzellen adoptiv transferiert wurden. Außerdem war der Anteil CD69⁺ T-Zellen unter den CD4⁺Thy1.1⁺ T-Zellen von Mäusen, die miR183-überexprimierende T-Zellen appliziert bekommen, signifikant höher als von Mäusen, die GFP exprimierende Kontrollzellen bekommen haben. Auch die CD69-Expressionsstärke (MFI-Wert) war in der CD4⁺Thy1.1⁺ T-Zellpopulation von miR183-überexprimierenden T-Zellen signifikant höher als in der CD4⁺Thy1.1⁺ T-Zellpopulation von GFP-überexprimierenden Kontrollzellen, wie in **Abbildung 29 D** gezeigt ist. Dieses Antigen-spezifische Autoimmundiabetes Modell lieferte also auch *in vivo* einen weiteren Hinweis darauf, dass miR183 die T-Zellproliferation und Hochexpression des Aktivierungsmarkers CD69 beschleunigt.

4.2.5 Expression des Transkriptionsfaktors EGR1 und des Signalmoleküls Akt in miR183-überexprimierenden CD4⁺ T-Zellen

Die durch die miR183-Überexpression beobachteten Veränderungen in CD4⁺ T-Zellen könnten durch die Aktivität des Transkriptionsfaktor *Early Growth Response-1* (EGR1) erklärt werden. Die EGR1 mRNA ist ein bereits beschriebenes Zielmolekül von miR183 [115]. Außerdem ist EGR1 dafür bekannt, dass es die Expression des *Phosphatase and Tensin Homologue deleted on Chromosom 10* (PTEN) direkt aktivieren kann [139]. PTEN hingegen hemmt die Aktivität von CD69 und die des PI3K-Signalweges, der u.a. über den Akt-Signalweg Effekte der T-Zellrezeptoraktivierung wie beispielsweise Proliferation vermittelt [140].

Da nun im Zuge dieser Arbeit durch die miR183-Überexpression eine erhöhte CD69 Expression und beschleunigte T-Zellproliferation gemessen wurden, war die nächste Frage, ob dies mit der Expression von EGR1 und dem Akt-Signalweg in Verbindung stehen könnte. Dazu wurde zunächst überprüft, ob die EGR1-Expression durch die miR183-Überexpression beeinflusst wird. Außerdem wurde die absolute Proteinmenge von Akt, aber auch die, der an Ser-473 und Thr-308 phosphorylierten und damit katalytisch aktiven Form in miR183-überexprimierenden CD4⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen und mit der von GFP-überexprimierenden Kontrollzellen verglichen.

Wie in **Abbildung 30 A** dargestellt, konnte eine signifikant verminderte EGR1-mRNA-Expression in miR183-überexprimierenden T-Zellen verglichen mit GFP-überexprimierenden Kontrollzellen, mittels qPCR gemessen werden. Außerdem wurde in miR183-überexprimierenden CD4⁺ T-Zellen eine signifikant erhöhte Proteinexpression von Akt und an Ser-473 und Thr-308 phosphoryliertem Akt durchflusszytometrisch gegenüber GFP-überexprimierenden Kontrollzellen gemessen werden (**Abbildung 30 B und C**).

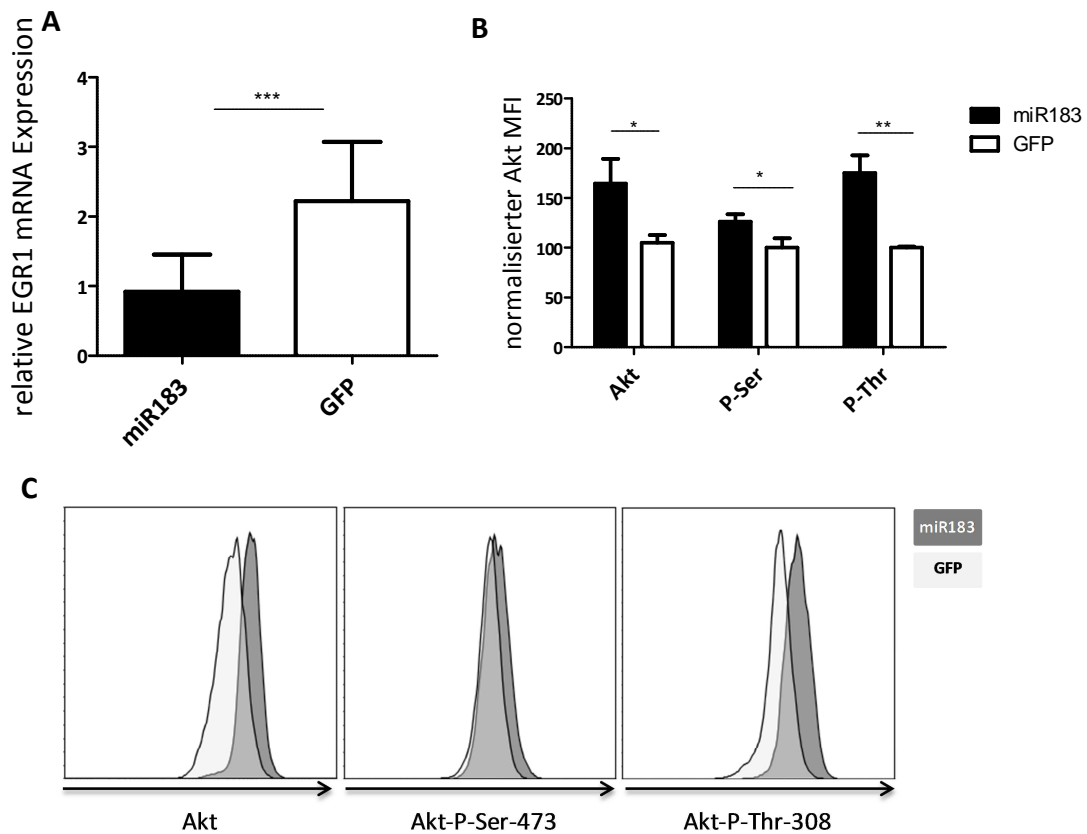


Abbildung 30: Expression des Transkriptionsfaktors EGR1 und des Signalmoleküls Akt in miR183 überexprimierenden T-Zellen. **A** Quantitative Real Time PCR der relativen EGR1-mRNA-Expression in miR183 überexprimierenden CD4⁺ T-Zellen verglichen mit GFP-überexprimierenden Kontrollzellen. Daten von drei Versuchen zusammengefasst. **B** und **C** Proteinmenge des Signalmoleküls Akt und seiner phosphorylierten Formen in sortierten miR183- und GFP-überexprimierenden CD4⁺ T-Zellen nach 1 h Aktivierung mit 1 µg/ml αCD3. **B** Histogramme des an die Expression von GFP-überexprimierenden T-Zellen normalisierten Akt-MFI der CD4⁺GFP⁺ Population von zwei Versuchen. **C** Repräsentative Bilder der durchflusszytometrischen Messungen von Akt und an Ser-473 und Thr-308 phosphoryliertem Akt. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test bestimmt.

Zusammengenommen konnte hier gezeigt werden, dass miR183 in CD4⁺ T-Zellen an der Vermittlung von aktivierenden Signalen beteiligt ist und die Aktivität von miR183 die Proliferation und den Aktivierungsstatus von CD4⁺ T-Zellen positiv beeinflusst. Außerdem konnte

gezeigt werden, dass diese Effekte auch *in vivo* zur T-Zellexpansion und daraus resultierend zu einer beschleunigten Immunantwort führten.

5. Diskussion

CD4⁺ T-Helferzellen sind essentielle Bestandteile einer adaptiven Immunantwort. Sie werden nicht nur für die Bekämpfung von und dem Schutz vor Infektionen mit pathogenen Erregern dringend benötigt, auch in der Immunantwort gegen entartete körpereigene Zellen ist ihre Funktion wichtig. Ein wichtiger Bestandteil ihrer Funktion ist die Aktivierung anderer Lymphozyten. Durch den aktivierenden Einfluss von CD4⁺ T-Zellen differenzieren CD8⁺ T-Zellen zu zytotoxischen T-Lymphozyten, die Virus-infizierte Zellen aber auch Tumorzellen erkennen und direkt lysieren können [8]. In B-Zellen wird die Keimzentrumsreaktion, die u.a. die Produktion von hoch affinen Antikörpern zur Folge hat, durch die Aktivität von CD4⁺ T-Zellen ausgelöst [10]. Auch für die Entstehung von Gedächtnis-B-Zellen und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen, die zusammen mit CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen bei einer Reinfektion mit demselben Erreger eine schnelle Immunantwort und so in vielen Fällen die Ausbreitung des Pathogens im Keim ersticken, sind CD4⁺ T-Zellen unerlässlich [9]. Eine weitere wichtige Funktion von CD4⁺ T-Zellen (Tregs) ist es zu erkennen, wann eine Immunantwort zu stark oder unangebracht ist [12]. Diese vielfältigen Funktionen werden zwar alle durch CD4⁺ T-Zellen vermittelt, deren Population ist allerdings ähnlich vielfältig. Die vier Hauptlinien von CD4⁺ T-Zellen (Th1, Th2, Th17 und Tregs) unterscheiden und definieren sich nicht nur über ihre Funktion, sondern auch durch die Expression und Sekretion von bestimmten Molekülen, die z.T. die Effektorfunktion vermitteln (Oberflächenmoleküle, Zytokine) aber auch an deren Regulation beteiligt sind (Transkriptionsfaktoren, miRNAs). Da sich die Effekte der einzelnen CD4⁺ T-Helferzellpopulationen nicht nur unterscheiden, sondern zum Teil auch entgegengesetzt wirken, ist es von enormer Bedeutung zu verstehen, wie jede einzelne dieser Populationen funktioniert und wie ihre Aktivität reguliert wird. Nur so kann in eine fehlgeleitete Immunantwort des hochkomplizierte Systems der CD4⁺ T-Zellen spezifisch und sinnvoll therapeutisch eingegriffen werden, ohne an anderer Stelle schädliche Funktionen auszulösen. Um das Verständnis von CD4⁺ T-Zellen zu erhöhen wurde in dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss das Oberflächenmolekül CD83 und miR183 auf die Funktion von CD4⁺ T-Zellen nehmen.

Das Oberflächenmolekül CD83 wird nach Zellaktivierung vor allem durch B-Zellen und DCs hoch reguliert und gilt als DC-Aktivierungsmarker, der mit erhöhten Effektorfunktionen assoziiert wird [48, 56, 58]. Die Expression von CD83 auf CD4⁺ T-Zellen ist hingegen wenig unter-

sucht und auch eher mit einem regulatorischen Phänotyp assoziiert. Die Analyse der CD83 Expression auf verschiedenen T-Zellsubpopulationen ($CD4^+CD25^-$, $CD4^+CD25^+$ und $CD8^+$) zeigte, dass nTregs nach T-Zellaktivierung CD83 deutlich höher exprimieren als T-Effektorzellen [41], was auf eine Treg-spezifische Funktion von CD83 in $CD4^+$ T-Zellen hinweist. Durch die retrovirale Überexpression von CD83 in aktivierten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen konnte in diesen mehrere Treg-assoziierte Merkmale *in vitro* induziert werden [41]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe einer transgenen Maus untersucht, welchen Einfluss die Überexpression von CD83 in naiven und aktivierten $CD4^+$ T-Zellen hat. In der CD83 transgenen Maus steht CD83 unter Kontrolle des CD4 Promotors, so dass CD83 in allen $CD4^+$ T-Zellen also auch in Tregs überexprimiert wird. Außerdem kann, dadurch dass es sich um eine transgene Maus handelt, in der *in vivo* Situation untersucht werden, wie sich die CD83-Überexpression auf die Entwicklung, Funktion und den Phänotyp von $CD4^+$ T-Zellen auswirkt. Obwohl in Balb/c Mäusen $CD4^+CD25^+$ nTregs mehr CD83 exprimieren ([41] und **Abbildung 7 B + C und D + E**) als $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, war der Anteil $CD83^+$ Zellen in der $CD4^+CD25^+$ und der $CD4^+FoxP3^+$ Population von CD4CD83 transgenen Mäusen geringer, als in der $CD4^+CD25^-$ T-Zellpopulation derselben Mäusen (**Abbildung 7 B + C und D + E**). Es kann also ausgeschlossen werden, dass die Überexpression von CD83 in CD4CD83 transgenen Mäusen nur Einfluss auf nTregs hat, sondern auch auf naive T-Zellen, da die Überexpression in naiven T-Zellen höhere Werte erreichte als in Tregs. Es wurde kein erhöhter Anteil an $CD4^+CD25^+$ oder $CD4^+FoxP3^+$ T-Zellen in der Milz und den mLKs in der CD4CD83 transgenen Maus gegenüber Balb/c Mäusen gemessen (**Abbildung 12**). Die FoxP3-Expression scheint also in der CD4CD83 transgenen Maus nicht durch die Überexpression von CD83 in naiven T-Zellen induzierbar zu sein. Auch scheint die Entwicklung von Tregs durch die transgene Überexpression von CD83 nicht beeinflusst zu werden. Anders als durch die retrovirale Überexpression [41] konnte auch kein suppressiver Phänotyp durch die CD83 Überexpression in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen *in vitro* induziert werden, da die inhibitorische Fähigkeit von $CD4^+CD25^+$ Tregs aus CD4CD83 transgenen Mäusen nicht verändert war, gegenüber Tregs aus nicht-transgenen Kontrollen (**Abbildung 13**). Desweiteren wurde auch die Proliferation von $CD4^+CD25^-$ und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus der CD4CD83 transgenen Maus *in vitro* durch die Überexpression von CD83 in $CD4^+$ T-Zellen nicht beeinflusst (**Abbildung 14**), wie es für die retrovirale Überexpression beschrieben wurde [41]. Eine mögliche Erklärung dafür, dass durch eine retrovirale Überexpression von CD83 in $CD4^+$ T-Zellen in diesen mehrere Treg-assoziierte Merkmale induziert werden konnten, die in

der CD4CD83 transgenen Maus nicht beobachtet wurden, könnte sein, dass durch die retrovirale Überexpression höhere Expressionswerte des Transgens erreicht werden konnten, die eventuell nötig sind um diese Effekte zu induzieren. Interessanterweise konnte aber eine verminderte IL17A Sekretion nach Stimulation von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CD4CD83 transgenen Mäusen *in vitro* detektiert werden, was auf eine Modulation des Phänotyps der CD4⁺ T-Zellen nach T-Zellaktivierung durch CD83 hindeutet.

In der Studie von Reinwald et al. konnte außerdem, durch die Injektion von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, die CD83 retroviral überexprimierten, Immunantworten in einer DNFB induzierte Kontaktallergie sowie in einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) abgemildert werden [41]. Auch die Immunreaktion gegen eine DNFB-vermittelte Kontaktallergie in der CD4CD83 transgenen Maus war signifikant vermindert gegenüber der Reaktion in nicht-transgenen Geschwistern. Dies ging einher mit einem erhöhten Anteil an CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten. Da Balb/c Mäuse weniger empfindlich auf die Induktion von EAE reagieren als andere Mausstämmen, konnte mit der CD4CD83 transgenen Maus nicht untersucht werden, wie sich die Überexpression von CD83 in CD4⁺ T-Zellen in der CD4CD83 Maus auf den Verlauf einer EAE auswirken würde. Beides sind Krankheitsmodelle, die durch die Injektion von CD4⁺CD25⁺ nTregs abgemildert werden können [141-143]. Da in den Ohr-drainierenden Lymphknoten von DNFB-behandelten CD4CD83 Mäusen tatsächlich mehr CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen gemessen wurden, liegt ein Zusammenhang zwischen diesem erhöhten Treg-Anteil und dem milderen Verlauf der Kontakallergie nahe (**Abbildung 16 A und B**).

Auch von der löslichen Form von CD83 wurde beschrieben, dass sie in einer Reihe von Krankheitsmodellen immunsuppressive Eigenschaften hatte [60-63]. In einem Modell wurde der Einfluss von sCD83 auf das Überleben eines Cornea-Transplantats untersucht und es konnte gezeigt werden, dass sich die Gabe von sCD83 positiv auf das Transplantatüberleben auswirkt, was auch mit einem erhöhten Anteil CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten einherging [63]. Es gibt also mehrere Hinweise darauf, dass CD83 entweder die FoxP3-Expression positiv beeinflusst oder die Migration von Tregs zum Entzündungsherd fördert. Für die DNFB-vermittelte Kontaktallergie konnte gezeigt werden, dass der Chemokin-Rezeptor CXCR3 für die Migration von Tregs zum Ort der Entzündung wichtig ist [144]. Bisher ist zwar kein Zusammenhang zwischen CXCR3 und CD83 publiziert worden, in weiterführenden, auf dieser Arbeit aufbauenden Analysen, könnte allerdings die CD4CD83-

überexprimierende Maus genutzt werden, um genauer zu untersuchen, wie die CD83 Expression mit einem erhöhten Treg-Anteil am Ort der Kontaktallergie in Zusammenhang steht. Dazu würde zunächst die *in vitro* Konversion von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus der CD4CD83 transgenen Maus in iTregs untersucht werden. Somit könnte geklärt werden, ob CD83 eine FoxP3-Expression auch in der CD4CD83 transgenen Maus unter bestimmten Bedingungen begünstigt, wie durch Reinwald et al. beschrieben wurde [41]. Zusätzlich könnte untersucht werden, ob die Überexpression von CD83 einen Einfluss auf die Migration von Tregs (z.B. durch CXCR3 vermittelt) hat.

Nicht nur Tregs sind für die Regulation einer Kontaktallergie wichtig. Auch von IL17A wurde beschrieben, dass es deren Verlauf beeinflusst [145, 146]. Ähnliches gilt auch für EAE [147, 148]. In einer IL17 defizienten Maus war die Kontaktallergie gehemmt und die Infiltration von Immunzellen am Ort der Entzündung wurde durch das Fehlen des IL17-Rezeptors verschlechtert [145, 146]. Durch die Überexpression von CD83 in der CD4CD83 transgenen Maus konnte eine Verschlechterung der IL17A Sekretion *in vitro* in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen nach T-Zellaktivierung gemessen werden (**Abbildung 15**). Auch der Anteil an IL17A-sezernierender $CD4^+$ T-Zellen in den Ohr-drainierenden Lymphknoten während einer DNFB-vermittelten Kontaktallergie war in CD4CD83 transgenen Mäusen vermindert (**Abbildung 16C**). Der mildere Verlauf der Kontaktallergie in CD4CD83 transgenen Tieren könnte also nicht nur auf den erhöhten Anteil von Tregs in den drainierenden Lymphknoten, sondern auch auf die verminderte Sekretion von IL17A zurückzuführen sein. Auch in manchen Formen von experimenteller Kolitis spielt IL17 eine Rolle und es konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von sCD83 während einer chemisch-induzierten Kolitis die Infiltration von Immunzellen in den Darm, die Menge an IL17 im Darm und die Schwere des klinischen Verlaufs vermindert waren. Auf den Anteil $CD4^+FoxP3^+$ T-Zellen in den mLKs hatte sCD83 in diesem Fall allerdings keinen Einfluss [62]. Dieses Beispiel zeigt, dass eine Verminderung von IL17 alleine sich schon positiv auf den Verlauf einer Entzündungsreaktion auswirken kann. In der CD4CD83 transgenen Maus aber auch in der Studie von Reinwald et al. konnte gezeigt werden, dass CD83 sowohl auf $FoxP3^+$ als auch auf IL17-sezernierende T-Zellen einen Einfluss hat [41]. Eine Möglichkeit wäre z.B., dass CD83 die Differenzierung einer naiven T-Zelle in Richtung iTreg begünstigt und gegenüber Th17 benachteiligend wirkt. Dies würde erklären wieso während einer Kontaktallergie nur in den Ohr-drainierenden Lymphknoten ein erhöhter Anteil $CD4^+FoxP3^+$ T-Zellen gemessen werden konnte, nicht aber in naiven CD4CD83 transgenen

Mäusen. Auch für die retrovirale Überexpression von CD83 in CD4⁺ T-Zellen wurden die T-Zellen aktiviert und es konnte ebenfalls die Induktion von Tregs sowie eine verminderte IL17A Sekretion nachgewiesen werden [41].

CD83 hat allerdings nicht nur einen Einfluss auf CD4⁺ T-Zellen, wenn es von den T-Zellen selbst exprimiert wird, sondern auch auf deren Entwicklung im Thymus, wenn es von anderen Zelltypen im Thymus exprimiert wird [59]. Das konnte durch eine CD83 Knock Out Maus gezeigt werden, deren CD83 defizienten T-Zellvorläuferzellen sich in wildtyp Mäusen nach Transfer normal entwickelten. CD83 kompetente T-Zellvorläuferzellen, transferiert in CD83 Knock Out Mäuse, konnten sich allerdings nicht in reife CD4⁺ T-Zellen entwickeln. Phänotypisch waren die peripheren CD4⁺ T-Zellen in der CD83 Knock Out Maus drastisch reduziert, der Anteil CD8⁺ und CD4⁺CD8⁺ Thymozyten war in diesen Mäusen nicht verändert [59]. In der CD4CD83 transgenen Maus hingegen, in der die CD83-Expression in CD4⁺ T-Zellen selbst verändert (hochreguliert) wurde, wurden ähnliche Effekte beobachtet. Im Thymus von CD4CD83 transgenen Mäusen wurden ebenfalls weniger CD4⁺ Thymozyten im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollen gemessen. Allerdings war auch der Anteil CD8⁺ Thymozyten vermindert und der Anteil CD4⁺CD8⁺ Thymozyten erhöht. Dies weist daraufhin, dass im Thymus die CD83 Expression nicht nur von anderen Zellen als T-Zellvorläufern, sondern auch die Expression von CD83 durch die T-Zelle selbst Einfluss auf die T-Zellentwicklung im Thymus hat. Allerdings konnte hier nicht ausgeschlossen werden, dass diese Beobachtungen in den CD4CD83 transgenen Mäusen auf die erhöhte CD83-Expression in CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen war (**Abbildung 6**).

Dies zeigt, dass es wichtig ist die Funktion von CD83 Zelltyp-spezifisch zu untersuchen. Deswegen wurde im Zuge dieser Arbeit erfolgreich eine CD83-Flox Maus generiert, mit der durch Verpaarung mit Cre-exprimierenden Mäusen CD83 in verschiedenen Zelltypen ausgeschaltet werden kann. Mit dieser Maus werden sich viele interessante Fragen bezüglich der Funktion von CD83 in CD4⁺ T-Zellen, aber auch in DCs oder B-Zellen beantworten lassen. Eine der interessantesten Fragen wird sein, ob durch den Verlust der CD83 Expression in FoxP3-exprimierenden Tregs (CD83-Flox x FoxP3-Cre) deren Suppressionsverhalten, die FoxP3-Expression, die IL10 Sekretion oder die Migration beeinflusst wird und was dies für Auswirkungen auf Immunreaktionen, wie Allergien oder Autoimmunerkrankungen hat an denen Tregs beteiligt sind. Durch Vergleich mit Ergebnissen aus einer Maus, in der CD83 in der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation ausgeschaltet wird (CD83-Flox x CD4-Cre), kann unterschieden

werden, welche Effekte von CD83 durch Tregs und welche von T-Effektorzellen vermittelt werden. So kann untersucht werden, ob CD83-defiziente CD4⁺ T-Effektorzellen mehr IL17A ausschütten und sich weniger FoxP3⁺ Tregs am Ort der Entzündung befinden und welcher Mechanismus die größere Rolle während einer Kontaktallergie spielt. Darüber hinaus kann die CD83-Flox-Maus auch zur Untersuchung der Rolle von CD83 bei der T-Zellreifung im Thymus verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass die Überexpression von CD83 in T-Zellen in der komplexen *in vivo* Situation einer transgenen Maus während einer Immunreaktion eher eine regulatorische Rolle spielt, also die regulatorischen T-Zellen fördert, wohingegen das Effektormolekül IL17A in CD4⁺ T-Zellen durch die CD83 Überexpression unterdrückt wurde. Dies korreliert mit den Ergebnissen einer retroviralen CD83-Überexpression in aktivierten CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* [41]. Außerdem konnte belegt werden, dass nicht nur sCD83 immunsuppressive Eigenschaften hat, sondern auch CD83 auf der Oberfläche von CD4⁺ T-Zellen.

Ein weiteres Molekül, das im Zusammenhang mit der Funktion von CD4⁺ T-Helferzellen in dieser Arbeit untersucht wurde, war miR183. miRNAs wurden als Regulatoren der Genexpression auf mRNA-Level identifiziert und es wurde festgestellt, dass mehr als die Hälfte der Änderungen im Transkriptom, die innerhalb einer Stunde nach T-Zellaktivierung auftreten durch posttranskriptionelle Regulationen auf mRNA-Ebene stattfinden [149]. Dadurch stellt sich die Frage, ob miRNAs auch in T-Zellen Funktionen übernehmen, die zu kennen zum Verständnis der T-Zellfunktion unerlässlich sind. Durch den Knock Out des miRNA-prozessierenden Enzyms *Dicer*, ohne dessen Aktivität keine funktionellen miRNAs gebildet werden, in CD4⁺ T-Zellen und spezifisch in FoxP3⁺ Tregs konnte gezeigt werden, dass auch in CD4⁺ T-Zellen miRNAs eine essentielle Rolle spielen. Nicht nur die Entwicklung von CD4⁺ T-Zellen im Thymus, auch deren periphere Funktionen wie Proliferation und Zytokin Sekretion waren gestört [85, 86]. Auch die *Dicer*-Depletion in Tregs zeigte sehr deutlich wie wichtig die Funktion von miRNAs in Tregs ist, da es durch den *Dicer* Knock Out zu einem kompletten Verlust der Treg-Funktion und damit verbunden zu verheerenden Autoimmunerkrankungen kam [87, 88].

Einige Beispiele für miRNAs, die in T-Zellen wichtige Funktionen übernehmen, konnten schon beschrieben werden. Zu den bisher am besten charakterisierten gehören miR155 und miR146a, die beide Moleküle regulieren, die für die intrazelluläre Signalweitergabe wichtig

sind [90, 92, 98-101]. In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Funktion miR183 in CD4⁺ T-Zellen übernimmt. Über miR183 ist vor allem viel über ihre Rolle als *Onco-miR* während der Tumorentstehung bekannt, da miR183 in vielen Tumorarten hochreguliert ist und Tumorentstehung und -migration begünstigt [109-113, 115]. In den Fokus dieser Arbeit ist miR183 dadurch gekommen, dass sie bei einer miRNA-Expressionsanalyse zu einigen miRNAs gehörte, die in naiven, aktivierten und Antigen-spezifischen Tregs differenziell zu T-Effektorzellen exprimiert wurde. Durch die Expressionsanalyse von miR183 vor und an verschiedenen Zeitpunkten nach T-Zellaktivierung in Gegenwart von IL2, wurde deutlich, dass miR183 zwar bis zu einem Tag nach T-Zellaktivierung in Zellen mit einem Treg-Phänotyp höher exprimiert wurde als in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, mehrere Tage nach T-Zellaktivierung hingegen wurde miR183 von T-Effektorzellen ebenfalls stark hoch reguliert (**Abbildung 21**). Daraus lässt sich schließen, dass miR183 in regulatorischen T-Zellen eine Funktion übernimmt, die schon vor T-Zellaktivierung für Tregs wichtig ist, in naiven T-Zellen aber eine untergeordnete Rolle spielt. Nach T-Zellaktivierung stieg das Expressionslevel von miR183 sowohl in Tregs als auch in T-Effektorzellen an, was auf eine Rolle von miR183 in beiden Populationen nach T-Zellaktivierung hindeutet, die nach T-Zellaktivierung in T-Effektorzellen aber deutlicher ausgeprägt war, da zu späteren Zeitpunkten deutlich höhere Werte der miR183-Expression in T-Effektorzellen gemessen wurden als in Tregs. Im Zuge dieser Arbeit wurden erfolgreich retrovirale Partikel generiert, die dazu benutzt werden konnten miR183 in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu überexprimieren (**Abbildung 22** und **Abbildung 23**) und somit zu untersuchen welchen Einfluss miR183 auf T-Zellen nimmt. Zunächst wurde untersucht, ob miR183 in die suppressive Funktion von Tregs involviert ist und ob durch die Überexpression von miR183 in T-Effektorzellen in diesen ein regulatorischer Phänotyp induziert werden kann, da miR183 in naiven Tregs höhere Expressionswerte zeigte als in naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen. Darüber hinaus wurde von miR183 in Gliomazellen beschrieben, dass sie durch das Targeting der Isocitrat Dehydrogenase 2 (IDH2) den Hypoxie induzierten Faktor 1 α (HIF-1 α) hochreguliert [150], der wiederum unter hypoxischen Bedingungen, wie sie während einer Entzündung vorherrschen, FoxP3 induziert [151]. Es zeigte sich allerdings, dass weder die Expression von Molekülen, wie FoxP3 oder CTLA-4 (**Abbildung 24**), die mit einem Tregs-Phänotyp in Verbindung gebracht werden, noch die Suppression der Proliferation von aktivierten T-Zellen (**Abbildung 25**) durch die miR183-Überexpression induziert werden konnte.

Als nächstes wurde untersucht, welchen Einfluss miR183 auf naive T-Zellen hat, da diese miR183 im naiven Zustand nur gering exprimierten, das miR183-Level nach T-Zellaktivierung aber deutlich hoch regulierten. Deshalb wurde als erstes untersucht, welchen Einfluss die miR183-Überexpression auf die T-Zellproliferation nach T-Zellstimulation hatte. Die T-Zellproliferation ist eine der wichtigsten Eigenschaften von T-Zellen und stellt sicher, dass während einer Immunantwort eine ausreichende Menge an T-Effektorzellen zur Verfügung steht. Durch die Überexpression von miR183 in T-Effektorzellen proliferierten diese signifikant besser als T-Zellen, die mit dem GFP-kodierenden Kontrollvektor transduziert wurden (**Abbildung 26**). Dies deutet darauf hin, dass miR183 einen enthemmenden Einfluss auf den Signalweg nach T-Zellrezeptoraktivierung ausübt, zu dessen Effekten die Proliferation gehört. Es war allerdings durch die miR183-Überexpression nicht nur die T-Zellproliferation, sondern auch die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 beeinflusst (**Abbildung 27**). CD69 gilt als der früheste Aktivierungsmarker von T-Zellen und wird innerhalb kurzer Zeit nach T-Zellstimulation auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert, dann allerdings nach 48 h auch schnell wieder herunterreguliert. In miR183-überexprimierenden T-Zellen wurde eine schnellere und höhere Expression von CD69 gegenüber den GFP-Kontrollvektor-überexprimierenden T-Zellen gemessen (**Abbildung 27**). Außerdem konnten eine signifikant erhöhte Menge des pro-inflammatorischen Zytokins IL17A und eine tendenziell erhöhte Menge des pro-inflammatorischen Zytokins IL6 nach T-Zellaktivierung gemessen werden (**Abbildung 28**), was ebenfalls auf eine verstärkte Aktivität der miR183-überexprimierenden T-Zellen hinweist.

Um festzustellen, ob diese Effekte der miR183-Überexpression stark genug sind, um während einer Immunantwort eine biologische Rolle *in vivo* zu spielen, wurde das Verhalten der miR183-überexprimierenden T-Zellen in einem Antigen-spezifischen Autoimmunmodell mit dem Verhalten von GFP-Kontrollvektor-überexprimierenden T-Zellen verglichen. Dieses Modell wurde ausgewählt, weil mit ihm der Einfluss einer verstärkten T-Zellaktivität untersucht werden kann. Die dazu benutzte INS-HA x RAG2KO Maus exprimiert das Modellantigen Hämagglutinin (HA) unter Kontrolle des Insulin-Promotors, zusätzlich hat diese Maus auf Grund des RAG2KO-Hintergrundes keine eigenen T- oder B-Zellen. Werden der INS-HA x RAG2KO Maus T-Zellen injiziert, deren T-Zellrezeptor HA spezifisch erkennt, führt das zur Zerstörung der HA-exprimierenden, Insulin-produzierenden Zellen und die Maus entwickelt Diabetes. Somit kann ein schneller ansteigender Blutzuckerspiegel auf eine höhere Aktivität der inji-

zierten T-Zellen hinweisen. Tatsächlich stieg der Blutzuckerspiegel von INS-HA x RAG2KO Mäuse, denen HA-spezifische T-Zellen injiziert wurden, die miR183-überexprimierten, schneller an als der Blutzuckerspiegel solcher Mäuse, in die nur GFP-Kontrollvektor-überexprimierenden T-Zellen transferriert wurden (**Abbildung 29 A**). In den mLKs der INS-HA x RAG2KO Mäuse, denen miR183-überexprimierende T-Zellen gespritzt wurden, wurde ein erhöhter Anteil an miR183-überexprimierender T-Zellen gegenüber INS-HA x RAG2KO Mäusen, denen dieselbe Anzahl GFP-Kontrollvektor-überexprimierender T-Zellen injiziert wurde gemessen. Dies könnte auf eine bessere Proliferation der miR183-überexprimierenden T-Zellen oder auf einer verstärkten Migration zurückzuführen sein, wobei die *in vitro* Daten eher auf eine bessere Proliferation hinweisen (**Abbildung 29 B**). Darüber hinaus zeigten die injizierten miR183-überexprimierenden T-Zellen durch einen höheren prozentualen Anteil von CD69 und eine erhöhte Expressionsstärke (MFI) von CD69 einen erhöhten Aktivierungsstatus gegenüber den nur GFP-Kontrollvektor-überexprimierenden T-Zellen (**Abbildung 29 C**). Somit konnte auch *in vivo* ein Einfluss von miR183 auf die T-Zellfunktion bestätigt werden.

Anschließend wurde untersucht, wie die verstärkte Proliferation und der erhöhte Aktivierungsstatus der miR183-überexprimierenden T-Zellen mit der Funktion von miR183 zusammenhängen. In der Literatur werden mehrere Ziel-mRNAs von miR183 beschrieben, darunter der Transkriptionsfaktor *Early Growth Response 1* (EGR1) [115]. Die Analyse, der mRNA-Expression von EGR1 in miR183-überexprimierenden T-Zellen im Zuge dieser Arbeit, zeigte tatsächlich eine Reduktion der EGR1 mRNA-Expression durch die Überexpression von miR183 verglichen mit GFP-Kontrollvektor-überexprimierenden T-Zellen (**Abbildung 30 A**). EGR1 aktiviert die Expression von *Phosphatase and Tensin Homologue deleted on Chromosome Ten* (PTEN) direkt [139, 152]. PTEN hingegen dephosphoryliert und hemmt damit Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate (PIP₃) das durch die Aktivität der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂) als Reaktion auf die Aktivierung des T-Zellrezeptors gebildet wird. Die Aktivität von PIP₃ führt u.a. zur Rekrutierung und Aktivierung des Signalmoleküls Akt, dessen Aktivität den Fortgang des Zellzykluses, Verhinderung von Apoptose, Zellmigration und Zelldifferenzierung zu Folge hat. Neben der Hemmung des PI3K Signalweges durch die Dephosphorylierung von PIP₃, hemmt PTEN die Oberflächenexpression von CD69 [140, 153]. Da im Zuge dieser Arbeit durch die Überexpression von miR183 in CD4⁺ T-Zellen eine erhöhte Proliferation und eine verstärkte

CD69 Expression gegenüber Kontrollen gemessen wurde, wurde als nächstes überprüfen, ob es durch eine Herunterregulation von EGR1 durch miR183, die zu einer Drosselung der Hemmung der CD69 Expression führte auch zur Aktivierung des Akt-Signalweges durch PIP₃ kommt. Dazu wurde die Proteinexpression des Signalmoleküls Akt und die Menge an phosphoryliertem und somit aktivem Akt in miR183 und GFP-Kontrollvektor-überexprimierenden T-Zellen gemessen. An Ser-473 und an Thr-308 phosphoryliertes Akt war in den miR183-überexprimierenden T-Zellen signifikant erhöht gegenüber den GFP-Kontrollvektor-überexprimierenden T-Zellen, was auf eine erhöhte Aktivität des Akt-Signalweges hinweist, womit die verstärkte Proliferation der miR183-überexprimierenden T-Zellen erklärt werden kann (**Abbildung 31**). Die absolute Menge von Akt war allerdings auch signifikant erhöht, was auf eine erhöhte Expression oder eine verminderte Degradation von Akt hinweist.

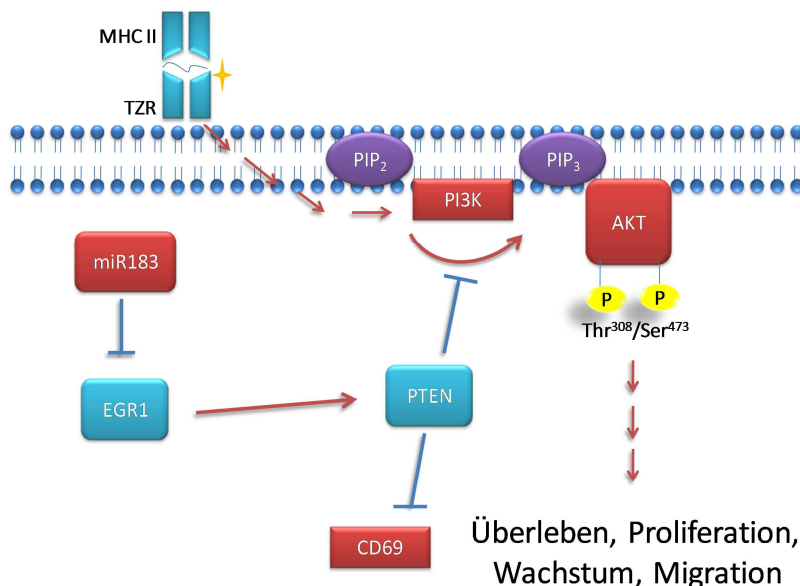


Abbildung 31: Schematische und vereinfachte Darstellung der hypothetischen Regulation der T-Zellproliferation und CD69-Expression durch miR183. Quellen siehe Text. TZR: T-Zellrezeptor

Ein Zusammenhang zwischen einer Akkumulation von hämatopoetischen Tumorzellen und miR183 wird allerdings auch von Liu et al. für die Entstehung der Juvenilen Myelomonozytären Leukämie (JMML) vorgeschlagen. Ähnlich wie in anderen Tumorarten wurde auch in JMML eine Hochregulation von miR183 beschrieben und konnte mit der erhöhten Menge monozytären Tumorzellen korreliert werden [154]. In CD4⁺ T-Zellen wird in dieser Arbeit allerdings zum ersten Mal beschrieben, dass miR183 an der Regulation der Proliferation und der Hochregulation von CD69 nach T-Zellaktivierung beteiligt ist.

Darüber welche Funktion die erhöhte Menge miR183 in regulatorischen T-Zellen hat, kann spekuliert werden, dass es der Aufrechterhaltung der proliferativen Fähigkeit und des Überlebens von Tregs dient ohne, dass es ein aktivierendes Signal gibt. Naive T-Zellen sollten in

Abwesenheit eines Stimulus nicht aktiviert werden. Dies korreliert sehr gut mit der gemessenen geringen Mengen an miR183. Tregs hingegen könnten durch eine leicht erhöhte Expression von miR183 auch ohne Stimulus in einem Zustand der Abrufbarkeit gehalten werden.

Zusammenfassend konnte also in dieser Arbeit für die Expression des Oberflächenmoleküls CD83 auf CD4⁺ T-Zellen eine regulatorische Wirkung beschrieben werden. Diese Ergebnisse und die im Zuge dieser Arbeit generierte CD83-Flox Maus können als Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Funktion und eventuell therapeutischen Manipulation von CD83 genutzt werden.

Für die Wirkung von miR183 auf CD4⁺ T-Zellen wurde in dieser Arbeit hingegen eine aktivierende Funktion beschrieben. Diese Funktion zu kennen und gegebenenfalls kontrollieren zu können, könnte für das Verständnis von Lymphomen und Leukämien wichtig sein. Auf der anderen Seite könnte die gezielte und kontrollierte Manipulation der miR183 eine Stellschraube sein, um einer Lymphopenie entgegenzuwirken.

6. Zusammenfassung

CD4⁺ T-Helferzellen übernehmen essentielle Aufgaben während einer Immunreaktion. Zu ihren Aufgaben gehören immunaktivierenden Funktionen, vermittelt durch die Subpopulationen der T-Effektorzellen sowie immunregulatorische Funktionen, die durch regulatorische T-Zellen vermittelt werden. Für eine funktionierende Immunantwort ist die richtige Balance der verschiedenen T-Helferzellpopulationen essentiell, denn ein Ungleichgewicht kann zu chronischen Infektionen, Tumoren, Allergien oder Autoimmunerkrankungen führen. Daher ist das Verständnis der Faktoren, die in die Funktion der verschiedenen CD4⁺ T-Helferzellpopulationen involviert sind von enormer Bedeutung für ein therapeutisches Eingreifen.

In dieser Arbeit wurden zwei Moleküle auf ihre Funktion in CD4⁺ T-Zellen hin untersucht. Zum einen wurde der Einfluss des Oberflächenmolekül CD83 auf die Funktion von CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe einer CD4CD83 transgenen Maus untersucht, die CD83 unter Kontrolle des CD4-Promotors überexprimiert. Phänotypisch wurde eine verminderte Menge an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie eine erhöhte Menge an CD4⁺CD8⁺ Thymozyten im Thymus dieser Mäuse gegenüber nicht-transgenen Geschwistern detektiert. In *in vitro* Analysen konnte kein regulatorischer Einfluss der CD83 Überexpression in CD4⁺ T-Zellen gemessen werden. Allerdings sezernierten die CD4CD83 transgenen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach Stimulation signifikant weniger IL17A als CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus nicht-transgenen Tieren. Darüber hinaus hatte eine DNFB-vermittelte Kontaktallergie in CD4CD83 transgenen Mäusen einen milderen Verlauf als in nicht-transgenen Kontrollen, was mit einem erhöhten Anteil CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen und einer verminderten Menge IL17A-sezernierender CD4⁺ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten einherging. Um die Funktion von CD83 insbesondere auf CD4⁺ T-Zellen weiter untersuchen zu können, wurde außerdem im Zuge dieser Arbeit eine CD83-Flox Maus generiert. Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss miR183 auf die Regulation der CD4⁺ T-Zellfunktion hat. In naiven Tregs wurden signifikant höhere miR183 Expressionswerte in regulatorischen T-Zellen als in naiven T-Zellen gemessen. Mehrere Tage nach Aktivierung jedoch waren die Werte in T-Effektorzellen höher, was auf eine Funktion von miR183 in beiden Populationen hindeutete. Um dies näher zu untersuchen, wurde miR183 mittels retroviralem Gentransfers in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen überexprimiert. Die funkti-

onelle Analyse zeigte keine Induktion eines regulatorischen Phänotyps, aber eine Verstärkung von Effektorfunktionen wie beschleunigte Proliferation und erhöhte CD69 Expression *in vitro*. Diese Effekte der miR183-Überexpression konnten in einem Antigen-spezifischen Diabetesmodell *in vivo* bestätigt werden. Mechanistisch konnten diese Effekte mit der Regulation des Transkriptionsfaktors EGR1 durch miR183 und einer verstärkten Aktivität des Akt-Signalweges in Zusammenhang gebracht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten dazu beitragen die Faktoren, die in die Funktion der verschiedenen CD4⁺ T-Helferzellpopulationen involviert sind besser zu verstehen, was für deren therapeutische Manipulation von großer Bedeutung ist.

7. Literatur

1. Evans ENaMJ: Transgenesis and Genetic Engineering in Domestic Animals Volume 1. Chichester: John Wiley & Sons 1992.
2. Magombedze G, Reddy PB, Eda S, Ganusov VV: Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses. *Front Physiol*, 4:206.
3. Carthew RW, Sontheimer EJ: Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009, 136(4):642-655.
4. Janeway CA Jr TP, Walport M, et al.: Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001.
5. Sant'Angelo DB, Lucas B, Waterbury PG, Cohen B, Brabb T, Goverman J, Germain RN, Janeway CA, Jr.: A molecular map of T cell development. *Immunity* 1998, 9(2):179-186.
6. Jameson SC, Bevan MJ: T-cell selection. *Curr Opin Immunol* 1998, 10(2):214-219.
7. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC: Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 2005, 5(10):772-782.
8. Wiesel M, Oxenius A: From crucial to negligible: functional CD8(+) T-cell responses and their dependence on CD4(+) T-cell help. *Eur J Immunol*, 42(5):1080-1088.
9. Prlic M, Williams MA, Bevan MJ: Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Curr Opin Immunol* 2007, 19(3):315-319.
10. Crotty S: Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*, 29:621-663.
11. Huber S, Gagliani N, Flavell RA: Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine. *Eur J Immunol*, 42(9):2238-2245.
12. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY: Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*, 30:531-564.
13. Koyasu S: The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol* 2003, 4(4):313-319.
14. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM: Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993, 260(5107):547-549.
15. Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE et al: T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(26):15137-15142.
16. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE: Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 1990, 172(3):921-929.
17. Tellier J, Nutt SL: The unique features of follicular T cell subsets. *Cell Mol Life Sci*, 70(24):4771-4784.
18. Kaplan MH: Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev*, 252(1):104-115.
19. Lin S, Yang X, Liang D, Zheng SG: Treg cells: a potential regulator for IL-22 expression? *Int J Clin Exp Pathol*, 7(2):474-480.
20. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA: FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*, 10(7):490-500.
21. Baecher-Allan C, Hafler DA: Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006, 212:203-216.

22. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M: Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008, 133(5):775-787.
23. Kretschmer K, Apostolou I, Jaekel E, Khazaie K, von Boehmer H: Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunol Rev* 2006, 212:163-169.
24. Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY: Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors. *Immunity* 2004, 21(2):267-277.
25. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ: How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008, 8(7):523-532.
26. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003, 299(5609):1057-1061.
27. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY: Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003, 4(4):330-336.
28. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD: Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003, 15(4):430-435.
29. Thornton AM, Shevach EM: CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998, 188(2):287-296.
30. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A: Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004, 34(9):2480-2488.
31. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2007, 8(12):1353-1362.
32. Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM: Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 2006, 107(10):3925-3932.
33. Ren X, Ye F, Jiang Z, Chu Y, Xiong S, Wang Y: Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells. *Cell Death Differ* 2007, 14(12):2076-2084.
34. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI: Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells. *Blood* 2007, 109(5):2058-2065.
35. Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, Drake CG, Powell JD: A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 2008, 111(1):251-259.
36. Oukka M: Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis* 2007, 66 Suppl 3:iii87-90.
37. Read S, Malmstrom V, Powrie F: Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000, 192(2):295-302.
38. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI et al: Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004, 21(4):503-513.
39. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, Flores M, Li N, Schweighoffer E, Greenberg S et al: Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 2008, 180(9):5916-5926.

40. Hansen W, Hutzler M, Abel S, Alter C, Stockmann C, Kliche S, Albert J, Sparwasser T, Sakaguchi S, Westendorf AM et al: Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J Exp Med*, 209(11):2001-2016.
41. Reinwald S, Wiethe C, Westendorf AM, Breloer M, Probst-Kepper M, Fleischer B, Steinkasserer A, Buer J, Hansen W: CD83 expression in CD4+ T cells modulates inflammation and autoimmunity. *J Immunol* 2008, 180(9):5890-5897.
42. Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF: A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* 1992, 149(2):735-742.
43. Breloer M, Fleischer B: CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis. *Trends Immunol* 2008, 29(4):186-194.
44. Twist CJ, Beier DR, Disteché CM, Edelhoff S, Tedder TF: The mouse Cd83 gene: structure, domain organization, and chromosome localization. *Immunogenetics* 1998, 48(6):383-393.
45. Berchtold S, Muhl-Zurbes P, Maczek E, Golka A, Schuler G, Steinkasserer A: Cloning and characterization of the promoter region of the human CD83 gene. *Immunobiology* 2002, 205(3):231-246.
46. Dudziak D, Kieser A, Dirmeier U, Nimmerjahn F, Berchtold S, Steinkasserer A, Marschall G, Hammerschmidt W, Laux G, Bornkamm GW: Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus induces CD83 by the NF-kappaB signaling pathway. *J Virol* 2003, 77(15):8290-8298.
47. McKinsey TA, Chu Z, Tedder TF, Ballard DW: Transcription factor NF-kappaB regulates inducible CD83 gene expression in activated T lymphocytes. *Mol Immunol* 2000, 37(12-13):783-788.
48. Zhou LJ, Tedder TF: Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995, 154(8):3821-3835.
49. Dudziak D, Nimmerjahn F, Bornkamm GW, Laux G: Alternative splicing generates putative soluble CD83 proteins that inhibit T cell proliferation. *J Immunol* 2005, 174(11):6672-6676.
50. Hock BD, Kato M, McKenzie JL, Hart DN: A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *Int Immunol* 2001, 13(7):959-967.
51. Lechmann M, Kotzor N, Zinser E, Prectel AT, Sticht H, Steinkasserer A: CD83 is a dimer: Comparative analysis of monomeric and dimeric isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 329(1):132-139.
52. Lechmann M, Kremmer E, Sticht H, Steinkasserer A: Overexpression, purification, and biochemical characterization of the extracellular human CD83 domain and generation of monoclonal antibodies. *Protein Expr Purif* 2002, 24(3):445-452.
53. Senechal B, Boruchov AM, Reagan JL, Hart DN, Young JW: Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood* 2004, 103(11):4207-4215.
54. Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, Schuler G, Steinkasserer A: The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med* 2001, 194(12):1813-1821.
55. Prectel AT, Turza NM, Theodoridis AA, Steinkasserer A: CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation. *J Immunol* 2007, 178(9):5454-5464.

56. Zhou LJ, Tedder TF: CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93(6):2588-2592.
57. Zhou LJ, Tedder TF: A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83⁺ blood dendritic cells. *Blood* 1995, 86(9):3295-3301.
58. Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, Bevec D, Kuhnt C, Steinkasserer A, Schuler G, Hauber J: Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *J Exp Med* 2000, 191(9):1581-1590.
59. Fujimoto Y, Tu L, Miller AS, Bock C, Fujimoto M, Doyle C, Steeber DA, Tedder TF: CD83 expression influences CD4⁺ T cell development in the thymus. *Cell* 2002, 108(6):755-767.
60. Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA: Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *J Immunol* 2002, 168(6):2599-2602.
61. Zinser E, Lechmann M, Golka A, Lutz MB, Steinkasserer A: Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble CD83. *J Exp Med* 2004, 200(3):345-351.
62. Eckhardt J, Kreiser S, Dobbeler M, Nicolette C, DeBenedette MA, Tcherepanova IY, Ostalecki C, Pommer AJ, Becker C, Gunther C et al: Soluble CD83 ameliorates experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol*.
63. Bock F, Rossner S, Onderka J, Lechmann M, Pallotta MT, Fallarino F, Boon L, Nicolette C, DeBenedette MA, Tcherepanova IY et al: Topical application of soluble CD83 induces IDO-mediated immune modulation, increases Foxp3⁺ T cells, and prolongs allogeneic corneal graft survival. *J Immunol*, 191(4):1965-1975.
64. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993, 75(5):843-854.
65. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391(6669):806-811.
66. Meister G, Tuschl T: Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004, 431(7006):343-349.
67. Kim VN: MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, 6(5):376-385.
68. Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004, 116(2):281-297.
69. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S et al: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003, 425(6956):415-419.
70. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC: The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 2007, 130(1):89-100.
71. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP: Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007, 448(7149):83-86.
72. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR: Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003, 17(24):3011-3016.
73. Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC: The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol* 2008, 15(4):354-363.
74. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS et al: MicroRNA inhibition of translation initiation in

- vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 2007, 317(5845):1764-1767.
75. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R: MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 2007, 447(7146):823-828.
 76. Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E: mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 2006, 20(14):1885-1898.
 77. Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF: Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 2006, 312(5770):75-79.
 78. Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S: Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* 2007, 21(15):1857-1862.
 79. Wu L, Fan J, Belasco JG: MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(11):4034-4039.
 80. Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA: Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 2006, 21(4):533-542.
 81. O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D: microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*, 30:295-312.
 82. Slegger K, Tang L, Moss EG: Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* 2002, 243(2):215-225.
 83. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D: Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 10(2):111-122.
 84. O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE: MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 11(3):163-175.
 85. Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, Hertweck A, O'Connor E, Godwin J, Wilson CB, Brockdorff N, Fisher AG, Smale ST et al: T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med* 2005, 201(9):1367-1373.
 86. Muljo SA, Ansel KM, Kanellopoulou C, Livingston DM, Rao A, Rajewsky K: Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J Exp Med* 2005, 202(2):261-269.
 87. Liston A, Lu LF, O'Carroll D, Tarakhovsky A, Rudensky AY: Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. *J Exp Med* 2008, 205(9):1993-2004.
 88. Zhou X, Jeker LT, Fife BT, Zhu S, Anderson MS, McManus MT, Bluestone JA: Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med* 2008, 205(9):1983-1991.
 89. Belver L, de Yebenes VG, Ramiro AR: MicroRNAs prevent the generation of autoreactive antibodies. *Immunity*, 33(5):713-722.
 90. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D: MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(5):1604-1609.
 91. O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D: Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(17):7113-7118.
 92. Lu LF, Thai TH, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, Loeb GB, Lee H, Yoshimura A, Rajewsky K et al: Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* 2009, 30(1):80-91.

93. Wang P, Hou J, Lin L, Wang C, Liu X, Li D, Ma F, Wang Z, Cao X: Inducible microRNA-155 feedback promotes type I IFN signaling in antiviral innate immunity by targeting suppressor of cytokine signaling 1. *J Immunol*, 185(10):6226-6233.
94. Androulidaki A, Iliopoulos D, Arranz A, Doxaki C, Schworer S, Zacharioudaki V, Margioris AN, Tschlis PN, Tsatsanis C: The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* 2009, 31(2):220-231.
95. O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, Kahn ME, Rao DS, Baltimore D: MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity*, 33(4):607-619.
96. Oertli M, Engler DB, Kohler E, Koch M, Meyer TF, Muller A: MicroRNA-155 is essential for the T cell-mediated control of *Helicobacter pylori* infection and for the induction of chronic Gastritis and Colitis. *J Immunol*, 187(7):3578-3586.
97. Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, Das PP, Miska EA, Rodriguez A, Bradley A et al: microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* 2007, 27(6):847-859.
98. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D: NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(33):12481-12486.
99. Zhao JL, Rao DS, Boldin MP, Taganov KD, O'Connell RM, Baltimore D: NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(22):9184-9189.
100. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M, Garcia-Flores Y, Luong M, Devrekanli A, Xu J et al: miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med*, 208(6):1189-1201.
101. Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, Yoshimura A, Baltimore D, Rudensky AY: Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*, 142(6):914-929.
102. Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Skare P et al: miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 2007, 129(1):147-161.
103. Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, Li Z, Wu Z, Pei G: MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol* 2009, 10(12):1252-1259.
104. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, Henderson JM, Kutok JL, Rajewsky K: Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 2008, 9(4):405-414.
105. Jindra PT, Bagley J, Godwin JG, Iacomini J: Costimulation-dependent expression of microRNA-214 increases the ability of T cells to proliferate by targeting Pten. *J Immunol*, 185(2):990-997.
106. Pierce ML, Weston MD, Fritzsche B, Gabel HW, Ruvkun G, Soukup GA: MicroRNA-183 family conservation and ciliated neurosensory organ expression. *Evol Dev* 2008, 10(1):106-113.
107. Lumayag S, Haldin CE, Corbett NJ, Wahlin KJ, Cowan C, Turturro S, Larsen PE, Kovacs B, Witmer PD, Valle D et al: Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(6):E507-516.
108. Patel M, Cai Q, Ding D, Salvi R, Hu Z, Hu BH: The miR-183/Taok1 target pair is implicated in cochlear responses to acoustic trauma. *PLoS One*, 8(3):e58471.

109. Zhang QH, Sun HM, Zheng RZ, Li YC, Zhang Q, Cheng P, Tang ZH, Huang F: Meta-analysis of microRNA-183 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with noncancerous tissues. *Gene*, 527(1):26-32.
110. Ueno K, Hirata H, Shahryari V, Deng G, Tanaka Y, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R: microRNA-183 is an oncogene targeting Dkk-3 and SMAD4 in prostate cancer. *Br J Cancer*, 108(8):1659-1667.
111. Li J, Fu H, Xu C, Tie Y, Xing R, Zhu J, Qin Y, Sun Z, Zheng X: miR-183 inhibits TGF-beta1-induced apoptosis by downregulation of PDCD4 expression in human hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer*, 10:354.
112. Lowery AJ, Miller N, Dwyer RM, Kerin MJ: Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 10:502.
113. Zhao H, Guo M, Zhao G, Ma Q, Ma B, Qiu X, Fan Q: miR-183 inhibits the metastasis of osteosarcoma via downregulation of the expression of Ezrin in F5M2 cells. *Int J Mol Med*, 30(5):1013-1020.
114. Zhang Z, Li S, Cheng SY: The miR-183 approximately 96 approximately 182 cluster promotes tumorigenesis in a mouse model of medulloblastoma. *J Biomed Res*, 27(6):486-494.
115. Sarver AL, Li L, Subramanian S: MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration. *Cancer Res*, 70(23):9570-9580.
116. Zhu W, Liu X, He J, Chen D, Hunag Y, Zhang YK: Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: a case control study. *BMC Cancer*, 11:393.
117. Wang G, Mao W, Zheng S: MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells. *FEBS Lett* 2008, 582(25-26):3663-3668.
118. Gordon JW, Ruddle FH: Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 1981, 214(4526):1244-1246.
119. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH: Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, 77(12):7380-7384.
120. Bishop JO, Smith P: Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA. *Mol Biol Med* 1989, 6(4):283-298.
121. Jaenisch R: Retroviruses and embryogenesis: microinjection of Moloney leukemia virus into midgestation mouse embryos. *Cell* 1980, 19(1):181-188.
122. Stewart CL, Schuetze S, Vanek M, Wagner EF: Expression of retroviral vectors in transgenic mice obtained by embryo infection. *EMBO J* 1987, 6(2):383-388.
123. Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS: Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 1985, 317(6034):230-234.
124. Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O: Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 1987, 330(6148):576-578.
125. Capecchi MR: Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989, 244(4910):1288-1292.
126. Bernstein A, Breitman M: Genetic ablation in transgenic mice. *Mol Biol Med* 1989, 6(6):523-530.
127. Baribault H, Kemler R: Embryonic stem cell culture and gene targeting in transgenic mice. *Mol Biol Med* 1989, 6(6):481-492.

128. Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981, 292(5819):154-156.
129. Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, 78(12):7634-7638.
130. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E: Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984, 309(5965):255-256.
131. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D: Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988, 336(6200):688-690.
132. Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R: Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83(23):9065-9069.
133. Sauer B, Henderson N: Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Res* 1989, 17(1):147-161.
134. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K: Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994, 265(5168):103-106.
135. Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K: Inducible gene targeting in mice. *Science* 1995, 269(5229):1427-1429.
136. Kirberg J, Baron A, Jakob S, Rolink A, Karjalainen K, von Boehmer H: Thymic selection of CD8+ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor. *J Exp Med* 1994, 180(1):25-34.
137. Lo D, Freedman J, Hesse S, Palmiter RD, Brinster RL, Sherman LA: Peripheral tolerance to an islet cell-specific hemagglutinin transgene affects both CD4+ and CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 1992, 22(4):1013-1022.
138. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM et al: RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992, 68(5):855-867.
139. Virolle T, Adamson ED, Baron V, Birle D, Mercola D, Mustelin T, de Belle I: The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol* 2001, 3(12):1124-1128.
140. Seminario MC, Precht P, Bunnell SC, Warren SE, Morris CM, Taub D, Wange RL: PTEN permits acute increases in D3-phosphoinositide levels following TCR stimulation but inhibits distal signaling events by reducing the basal activity of Akt. *Eur J Immunol* 2004, 34(11):3165-3175.
141. McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM: Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 2005, 175(5):3025-3032.
142. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD: Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002, 169(9):4712-4716.
143. Honda T, Miyachi Y, Kabashima K: The role of regulatory T cells in contact hypersensitivity. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 4(2):85-89.
144. Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Ohmatsu H, Okochi H, Sato S: CXCR3 deficiency prolongs Th1-type contact hypersensitivity. *J Immunol*, 190(12):6059-6070.

145. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y: Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 2002, 17(3):375-387.
146. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmetts CA, Xu H: IL-17 and IFN-gamma mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses. *J Immunol* 2009, 183(2):1463-1470.
147. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q et al: A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005, 6(11):1133-1141.
148. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y: IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006, 177(1):566-573.
149. Cheadle C, Fan J, Cho-Chung YS, Werner T, Ray J, Do L, Gorospe M, Becker KG: Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *BMC Genomics* 2005, 6:75.
150. Tanaka H, Sasayama T, Tanaka K, Nakamizo S, Nishihara M, Mizukawa K, Kohta M, Koyama J, Miyake S, Taniguchi M et al: MicroRNA-183 upregulates HIF-1alpha by targeting isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) in glioma cells. *J Neurooncol*, 111(3):273-283.
151. Clambey ET, McNamee EN, Westrich JA, Glover LE, Campbell EL, Jedlicka P, de Zoeten EF, Cambier JC, Stenmark KR, Colgan SP et al: Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(41):E2784-2793.
152. Baron V, Adamson ED, Calogero A, Ragona G, Mercola D: The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFbeta1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Ther* 2006, 13(2):115-124.
153. Buckler JL, Liu X, Turka LA: Regulation of T-cell responses by PTEN. *Immunol Rev* 2008, 224:239-248.
154. Liu YL, Lensing SY, Yan Y, Cooper TM, Loh ML, Emanuel PD: Deficiency of CREB and over expression of miR-183 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*, 27(7):1585-1588.

8. Verzeichnisse

8.1 Abkürzungsverzeichnis

(m)LK	(mesenterische) Lymphknoten
(q)PCR	(quantitative) Polymerase Kettenreaktion
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
bp	Basenpaar
CAF1	engl. <i>CCR4-associated factor 1</i>
Ccr4	engl. <i>Carbon Catabolite Repression 4- homolog Cytoplasmic dead- enylase</i>
CD	engl. <i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
cMaf	engl. <i>v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene hom- olog</i>
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CMV	Cytomegalie Virus
Cre	engl. <i>Causes Recombination</i>
CTL	Zytotoxische T-Zelle
CTLA-4	engl. <i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4</i>
DCs	Dendritische Zellen
Dcp1	engl. <i>Decapping Protein 1</i>
DGCR8	engl. <i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i>
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNFB	Dinitrofluorobenzen
dNTP	Desoxynukleotid Triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGR1	engl. <i>Early Growth Response 1</i>
eIF	eukryotischer Initiations Faktor
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FACS	engl. <i>Fluorescence Activates Cell Sorter</i>
FBS	Fetales bovines Serum
FCS	Fetales Kälberserum
fl	Flox
FoxP3	Forkhead Box P3
GATA3	GATA-bindendes Protein 3
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GW182	engl. <i>GW-body Protein 182; Gawky</i>
HA	Hämagglutinin
het	heterozygot
HIF1	engl. <i>Hypoxia inducible Factor 1α</i>
hom	homozygot
IDH2	Isocitrat Dehydrogenase
IDO	Indoleamin 2,3-Dioxygenase

IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves Modifiziertes Dulbeccos Medium
IPEX	engl. <i>Immune Dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrom</i>
IRAK1	Interleukin-1 assoziierte Kinase 1
IRES	engl. <i>Internal ribosomal entry site</i>
IVC	individuell ventilierter Käfig
JMML	Juvenilen Myelomonozytären Leukämie
kb	Kilobasen
KO	Knock Out
LAG-3	engl. <i>Lymphocyte-Activation-Gene-3</i>
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
LoxP	engl. <i>Locus of Cross Over</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	engl. <i>Long Terminal Repeats</i>
Luc	Luciferase
MACS	engl. <i>Magnetic Cell Separation</i>
mCAT1	muriner kationischer Aminosäure Transporter 1
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MFI	engl. <i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MHC	engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>
miRNA	mikroRNA
mRNA	engl. <i>Messenger RNA</i>
NF κ B	engl. <i>Nuclear Factor κB</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
Not	engl. <i>Negative regulator of transcription</i>
nt	Nukleotid
PABP1	engl. <i>Polyadenylate-binding protein 1</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDCD4	engl. <i>Programmed Cell Death 4</i>
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Azetat
PTEN	engl. <i>Phosphatase and Tensin Homologue deleted on Chromosom Ten</i>
RAG	engl. <i>Recombination Activating Gene</i>
RISC	engl. <i>RNA-induced Silencing Complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
ROR γ t	engl. <i>RAR-related Orphan Receptor γt</i>
RPS9	Ribosomales Protein 9
SDS	Natrium Dodecylsulphat
Ser	Serin
SHIP1	engl. <i>Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1</i>
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i>
SOCS1	engl. <i>Suppressor of Cytokine Signaling 1</i>
SPE	Spezifisch Pathogen-frei
STAT1	engl. <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
TBE	Tris, Bohr, EDTA
T-bet	T-box Transkriptionsfaktor

TCR	T-Zellrezeptor
TGF- β	engl. <i>Transforming Growth Factor β</i>
Th	T-Helferzelle
Thr	Threonin
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRAF6	engl. <i>TNF Receptor associated Factor 6</i>
TRAIL	engl. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRBP	<i>human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein</i>
Tregs (iTregs, nTregs)	Regulatorische T-Zellen (i=induziert, n=natürlich vorkommend)
U	Unit
UTR	untranslatierte Region
VEGF	engl. <i>Vaskular Endothelial rowth Factor</i>
wt	wildtyp
α	anti

8.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMARTISCHE DARSTELLUNG DER DIFFERENZIERUNG EINER CD4 ⁺ NAIVEN T-ZELLE IN EINE T-EFFEKTORZELLE	10
ABBILDUNG 2: ZUSAMMENFASSUNG DER WICHTIGSTEN SUPPRESSIONSMECHANISMEN VON TREGS UND BETEILIGTER MOLEKÜLE. ...	12
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MIRNA PROZESSIERUNG UND DEREN ASSOZIATION MIT RISC.....	17
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VERSCHIEDENER MECHANISMEN DER TRANSLATIONALEN HEMMUNG DURCH MIRISC.	18
ABBILDUNG 5: SCHEMARTISCHE DARSTELLUNG DES VERLAUFS DER GENERIERUNG EINER TRANSGENEN MAUS MITTELS ES-ZELLMANIPULATION UND BLASTOZYSTEN-INJEKTION.....	22
ABBILDUNG 6: SCHEMARTISCHE DARSTELLUNG DES EINGEFÜGTEN TRANSGENS IN DER CD4CD83 TRANSGENEN MAUS UND VERGLEICH DES CD83 MRNA GEHALTES IN VERSCHIEDENEN IMMUNZELLEN VON CD4CD83 TRANSGENEN UND BALB/C MÄUSEN.....	47
ABBILDUNG 7: ANTEIL CD83 ⁺ T-ZELLEN IM THYMUS VON CD4CD83 TRANSGENEN UND BALB/C MÄUSEN.....	48
ABBILDUNG 8: ANTEIL CD83 ⁺ T-ZELLEN IN DER MILZ VON CD4CD83 TRANSGENEN UND BALB/C MÄUSEN	49
ABBILDUNG 9: CD83 EXPRESSION IN CD4 ⁺ UND CD8 ⁺ T-ZELLEN, SOWIE CD19 ⁺ B-ZELLEN AUS DER MILZ VON CD4CD83 TRANSGENEN UND NICHT-TRANSGENEN MÄUSEN NACH <i>IN VITRO</i> STIMULATION ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 3 TAGEN.	50
ABBILDUNG 10: VERTEILUNG VON CD4 ⁺ , CD8 ⁺ UND CD4 ⁺ CD8 ⁺ T-ZELLEN IM THYMUS VON HOMOZYGOT UND HETEROZYGOT TRANSGENEN CD4CD83 MÄUSEN SOWIE BALB/C MÄUSEN.....	51
ABBILDUNG 11: VERTEILUNG VON CD4 ⁺ UND CD8 ⁺ T-ZELLEN IN DER MILZ UND DEN MLKS VON HOMOZYGOT UND HETEROZYGOT TRANSGENEN CD4CD83 MÄUSEN SOWIE BALB/C MÄUSEN.....	52
ABBILDUNG 12: VERTEILUNG VON CD4 ⁺ CD25 ⁺ UND CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ TREGS IN DER MILZ UND DEN MLKS VON HOMOZYGOT UND HETEROZYGOT TRANSGENEN CD4CD83 MÄUSEN SOWIE BALB/C MÄUSEN.....	52
ABBILDUNG 13: ANALYSE DER INHIBITORISCHEN EIGENSCHAFT VON CD4 ⁺ CD25 ⁺ TREGS UND CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-ZELLEN IN CO-KULTUR MIT CFSE MARKIERTEN WILDTPY RESPONDER ZELLEN.....	53
ABBILDUNG 14: ANALYSE DER PROLIFERATIVEN EIGENSCHAFT VON CFSE MARKIERTEN CD4 ⁺ CD25 ⁺ TREGS UND CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-ZELLEN	54
ABBILDUNG 15: ANALYSE DER SEZERNIERTEN ZYTOKINE IM ZELLKULTURÜBERSTAND DER PROLIFERATIONSASSAYS	55

ABBILDUNG 16: DNFB-VERMITTELTE KONTAKTALLERGIE IN HOMOZYGOTEN CD4CD83 TRANSGENEN MÄUSEN IM VERGLEICH ZU BALB/C MÄUSEN.....	56
ABBILDUNG 17: SOUTHERN BLOT SCREENING VON 600 ES-ZELLKLONEN, DIE DAS CD83-TARGETINGKONSTRUKT POTENZIELL AN DER RICHTIGEN STELLE UND IN VOLLER LÄNGE INS GENOM INTEGRIERT HABEN.....	57
ABBILDUNG 18: CHIMÄRE UND CD83-FLOX MÄUSE	58
ABBILDUNG 19: AGAROSEGELE MIT PCR PRODUKTEN EINES SPEZIFISCHEN NACHWEISES VON CRE, NEO ^R , KO AUS CD83 ^{FL} -NEO ^R X CMV-CRE MÄUSEN	59
ABBILDUNG 20: CD83 EXPRESSION IN GESAMTMILZ UND -MLKS NACH 24 H STIMULATION MIT 1 µG/ML ACD3 UND 1 µG/ML LPS61	
ABBILDUNG 21: MESSUNG DER MIR183 EXPRESSION MITTELS QPCR.....	62
ABBILDUNG 22: RETROVIRALE ÜBEREXPRESSION VON MIR183 IN CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-ZELLEN	63
ABBILDUNG 23: RELATIVE LUCIFERASE (LUC) AKTIVITÄT VON GPR86 ZELLEN, DIE MIT RETROVIRALEN VEKTOREN, DIE ENTWEDER MIR183 UND GFP ODER GFP ALLEINE EKTOPISCH ÜBEREXPRIMIERTEN.....	63
ABBILDUNG 24: REPRÄSENTATIVE DOTPLOTS EINER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN MESSUNG VON CTLA4 UND FOXP3 IN MIR183 ÜBEREXPRIMIERENDEN T-ZELLEN, DEN GFP KONTROLLVEKTOR-EXPRIMIERENDEN T-ZELLEN ODER FRISCH ISOLIERTEN MILZZELLEN EINER BALB/C MAUS.....	64
ABBILDUNG 25: ANALYSE DER INHIBITORISCHEN EIGENSCHAFT VON FRISCH ISOLIERTEN CD4 ⁺ CD25 ⁺ TREGS BZW. NAIVEN T-ZELLEN UND CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-ZELLEN, DIE ENTWEDER MIR183 ODER GFP RETROVIRAL ÜBEREXPRIMIERTEN IN CO-KULTUR MIT eFLUOR670 MARKIERTEN BALB/C RESPONDER ZELLEN	65
ABBILDUNG 26: ANALYSE DER PROLIFERATIVEN EIGENSCHAFT VON CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-ZELLEN, DIE ENTWEDER MIR183 ODER DEN GFP-KONTROLLVEKTOR EXPRIMIEREN IN CO-KULTUR MIT eFLUOR670 MARKIERTEN WILDTYP RESPONDER ZELLEN.....	65
ABBILDUNG 27: CD69, CD25, UND CD44 EXPRESSION AUF MIR183 BZW. GFP-ÜBEREXPRIMIERENDEN T-ZELLEN.....	66
ABBILDUNG 28: ANALYSE DER SEZERNIERTEN ZYTOKINE IM ZELLKULTURÜBERSTAND DER PROLIFERATIONSASSAYS	67
ABBILDUNG 29: EFFEKT DER MIR183 ÜBEREXPRESSION IN CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-ZELLEN WÄHREND EINES AUTOIMMUNDIABETES.....	68
ABBILDUNG 30: EXPRESSION DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS EGR1 UND DES SIGNALMOLEKÜLS AKT IN MIR183 ÜBEREXPRIMIERENDEN T-ZELLEN	70
ABBILDUNG 31: SCHEMATISCHE UND VEREINFACHTE DARSTELLUNG DER HYPOTETISCHEN REGULATION DER T-ZELLPROLIFERATION UND CD69-EXPRESSION DURCH MIR183	81

Zuallererst bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Wiebke Hansen nicht nur für die Möglichkeit bei Ihr zu promovieren, für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit und die hervorragende Betreuung, sondern vor allem für endlose Geduld und Unterstützung, motivierende Worte und die vielen Möglichkeiten und Freiheiten Dinge auszuprobieren.

Danken möchte ich außerdem Herrn Prof. Dr. Jan Buer, dafür dass ich in seinem Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen die Möglichkeit zur Promotion bekommen habe und dafür, dass er immer unkomplizierte Lösungen für Probleme gefunden hat.

Desweiteren bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Astrid Westendorf für die sehr gute Zusammenarbeit der beiden Arbeitsgruppen Westendorf und Hansen, für die Unterstützung während meiner Promotion und für interessante und offene Diskussionen.

Ein großes Dankeschön gebührt den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der beiden Arbeitsgruppen Hansen und Westendorf. Vor allem von Tanja, Simone und Diana habe ich sehr viel gelernt. Unverzichtbare, oft spontane und sehr verlässliche Hilfe habe ich von Caro, Katharina und Sina bekommen. Bei Withold, Patrick und Annika bedanke ich mich für die vielen geduldigen Stunden am Sorter auch wenn es auch mal nix zu sortieren gab... Bei Mechthild bedanke ich mich für Luminex-Analysen und ihr immer offenes Ohr. Bei allen (Gini, Annika, Torben, Caro, Sina, Munisch, Patrick, Mechthild, Withold, Simone, Alexandra Eva, Marina), möchte mich besonders dafür bedanken, dass ich Hilfe bekommen habe, wenn ich sie brauchte, dass immer ein Kompromiss gefunden wurde, wenn der FACS-Kalender voll war und, dass das Arbeitsklima sehr angenehm war!

Auch bei Prof. Dr. Carsten Kirschning und seinen Mitarbeitern möchte ich mich für die Bereitstellung von Gerät und Chemikalien für die Luciferase-Assay bedanken. Für die Einweisung, für jede sonstige Hilfe und nettes Gespräch bedanke ich mich bei Anna, Marina, Sabine, Thomas, Chiranjeevi und Anne.

Bei Dr. Nadine Hövelmeyer, Prof. Dr. Ari Waisman, Dr. Thomas Wunderlich und Christian Reichhold bedanke ich mich dafür, dass ich die Stammzellarbeit und die Southern Blots im Institut für Molekulare Medizin der Universitätsmedizin Mainz durchführen und dabei unverzichtbare Hilfe bekommen habe.

Vielen Dank an Steffi, Markus, Julia, Nora, Nadine, Lisa, Martin und Torben für mittwochs in der Mensa, Grillen, Cocktails und Spieleabende, für geteiltes Leid und halbes Leid, für Klatsch und Tratsch und vor allem für mittlerweile fast zehn gemeinsame Jahre an der Universität Duisburg-Essen!

Bedanken möchte ich mich auch beim Graduierten Kolleg 1431 und hier besonders bei Carina, Maria, Verena, Anne, Bernadette und Christian für leckere Cocktails aber vor allem für große moralische Unterstützung!

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester Silvia und meiner Oma dafür bedanken, dass ich mich immer auf sie verlassen konnte und kann und immer in allem Unterstützung und Ermutigung fand und finde!

Meinem Freund Stefan gebührt ein riesiger Dank für seinen Einsatz und seine unendliche Unterstützung und dafür, dass er unermüdlich für mich da ist.

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

10. Erklärungen:

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Einfluss der Überexpression von CD83 und miR183 in CD4⁺ T-Zellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Christina Alter befürworte.

Essen, den _____
Prof. Dr. Wiebke Hansen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____
Christina Alter

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____
Christina Alter